

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke
Schwerpunkt Endokrinologische Forschung
Leiter: Prof. Dr. med. F. Beuschlein

Charakterisierung der Entwicklung testikulärer adrenaler Resttumore im Tiermodell

21-Hydroxylase defizienter Mäuse

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Maximilian Weniger
aus Augsburg

2016

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatlerin: Priv. Doz. Dr. med. Nicole Reisch

Mitberichterstatler: Prof. Dr. Thomas Knösel
Priv. Doz. Dr. med. Frank Strittmacher

Betreuung durch: Prof. Dr. med. Felix Beuschlein

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2016

Für meine Eltern

Charakterisierung der Entwicklung testikulärer adrenaler Resttumore im Tiermodell 21-Hydroxylase defizienter Mäuse

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	10
1.1. Pathophysiologie und molekularer Hintergrund	10
1.2. Klinisches Bild, Diagnose, Therapie und Komplikationen	11
1.3. Testikuläre und ovarielle adrenale Resttumore.....	15
1.4. 21-Hydroxylase Defizienz im Mausmodell	16
1.5. Adrenale und testikuläre Markergene	18
1.5.1. CYP21A1	18
1.5.2. CYP11B1	19
1.5.3. CYP11B2	19
1.5.4. MC2R.....	19
1.5.5. CYP11A1	19
1.5.6. CYP17A1	19
1.5.7. INSL3.....	20
1.5.8. AMH.....	20
1.6. Vorerkenntnisse zur Entwicklung testikulärer und adrenaler Resttumore im Mausmodell.....	21
1.7. Intention dieser Arbeit	22
2. Material und Methoden	23
2.1. Tierzucht, timed pregnancy studies und Gewebegewinnung.....	23
2.2. Genotypisierung.....	26
2.2.1. DNA-Extraktion.....	26
2.2.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)	27
2.2.3. Agarose-Gelelektrophorese mit DNA.....	28
2.3. RNA-Extraktion	28
2.4. Reverse Transkription	29
2.5. Real-Time PCR	30
2.5.1. Verfahren	30
2.5.2. Referenz- und Zielgene.....	31
2.5.3. Auswertung der Real-time PCR	32

2.6.	Immunhistochemie	34
3.	Ergebnisse.....	36
3.1.	Genotypisierung.....	36
3.2.	HE-Färbung.....	37
3.3.	Immunhistochemie	38
3.4.	Real-time PCR.....	41
4.	Diskussion.....	45
4.1.	Adrenale Resttumore bei Mäusefeten.....	45
4.2.	Adrenale und testikuläre Expression adrenaler Markergene	46
4.3.	Testikuläre Expression adrenaler Markergene im Verlauf der fetalen und postpartalen Entwicklung	46
4.4.	Adrenale Expression von INSL3	49
5.	Fazit und Zusammenfassung.....	50
6.	Literaturverzeichnis.....	51
7.	Abkürzungsverzeichnis	56
8.	Danksagung	58
9.	Publikationen.....	59
9.1.	Vorträge	59
9.2.	Übersichtsarbeiten	59
10.	Eidesstattliche Versicherung.....	60

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Adrenale und testikuläre Steroidsynthese bei 21OHD-Mäusen	17
Abb. 2:	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse bei 21OHD-Mäusen	18
Abb. 3:	Schematische Darstellung der Organspezifität typischer adrenaler und testikulärer Markergene	20
Abb. 4:	Genotypisierung von Feten des Gestationsalters E18.5 (Beispiel)	37
Abb. 5:	HE-Färbung von fetalen Nebennieren und Hoden (E18.5)	38
Abb. 6:	Überblick über die IHC von fetalen Nebennieren und Hoden (E18.5).	40
Abb. 7:	Relative Quantifizierung der Expression von Enzymen der Steroidbiosynthese und hodenspezifischer Gene in fetalen Nebennieren (E18.5) auf Basis des Referenzgens 18S.....	43
Abb. 8:	Relative Quantifizierung der Expression von Enzymen der Steroidbiosynthese und hodenspezifischer Gene in fetalen Hoden (E18.5) auf Basis des Referenzgens 18S. ..	44
Abb. 9:	Gestations- bzw. Lebensalter-abhängige Darstellung der Ergebnisse dieser Arbeit (rot) und vorangegangener in vitro und in vivo Experimente bei Mäusen, bei denen der Effekt von ACTH oder HCG auf die Expression von CYP11B1 oder CYP21A1 im Hoden untersucht wurde.....	48

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Dehydrierung von fetalen Nebennieren (E18.5)	25
Tabelle 2: Dehydrierung von fetalen Hoden (E18.5).....	26
Tabelle 3: Zur Genotypisierung verwendete Primer	27
Tabelle 4: Für die Real-time PCR verwendete Primer (Referenzgene)	31
Tabelle 5: Für die Real-time PCR verwendete Primer (Zielgene)	31
Tabelle 6: Verwendete Primär-Antikörper.....	36
Tabelle 7: Verwendeter Sekundär-Antikörper	36
Tabelle 8: Häufigkeitsverteilung der Genotypen	37
Tabelle 9: Übersicht der Ergebnisse der real-time PCR für fetale Nebennieren (E18.5).	42
Tabelle 10: Übersicht der Ergebnisse für fetale Hoden (E18.5)	42

Formelverzeichnis

Formel 1: Amplifikationseffizienz E	33
Formel 2: Relative Expressionsrate r	33
Formel 3: Relatives Expressionsverhältnis R	33

1. Einleitung

1.1. Pathophysiologie und molekularer Hintergrund

Das adrenogenitale Syndrom (AGS) ist eine der häufigsten autosomal-rezessiv vererbten Stoffwechselerkrankungen. Das AGS beschreibt dabei eine Gruppe von Störungen der Kortisolbiosynthese, die in einem Mangel an Kortisol bei gleichzeitigem Überschuss an adrenalen Androgenen resultieren. Zusätzlich kann ein Defizit an Aldosteron auftreten. 95% der Patienten sind von einem Defekt der 21-Hydroxylase (21OHD) betroffen [1], der in dieser Arbeit Grundlage aller Hypothesen, Versuche und Diskussionen ist.

Das adrenogenitale Syndrom wird in Abhängigkeit der Schwere des Enzymdefekts und des klinischen Bildes in das klassische und nicht-klassische AGS unterteilt. Schwere Verlaufsformen werden als klassisches AGS bezeichnet. Etwa zwei Drittel der Patienten mit klassischem AGS sind neben Kortisolmangel- und Androgenexzess zusätzlich von einem Mangel an Aldosteron betroffen („salt wasting“ (SW)). Etwa ein Drittel der Patienten mit klassischem AGS zeigt nur Kortisolmangel und Androgenexzess, die einfach virilisierende Form („simple virilising“ (SV)). Das nicht-klassische AGS fasst mildere Verläufe des AGS zusammen, bei denen häufig noch eine Enzymrestfunktion von 30-50% vorhanden ist [1, 2].

Die klassische Form des AGS tritt mit einer Inzidenz von etwa 1:11 000 Geburten auf, wobei einzelne Populationen deutlich erhöhte Inzidenzen aufweisen können. So sind beispielsweise die Yupik-Eskimos und die Bewohner von La Réunion mit einer Inzidenz von 1:300 bzw. 1:6000 betroffen [3-5]. Die Inzidenz des nicht-klassischen AGS wird auf etwa 1:1000 Geburten geschätzt [1, 4].

Für die 21-Hydroxylase Defizienz ist eine Vielzahl genetischer Mutationen beschrieben, die ein Kontinuum an unterschiedlich starken Einschränkungen der enzymatischen Aktivität der 21-Hydroxylase erzeugen. Das codierende Gen für die 21-Hydroxylase (CYP21A2) liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 (6p21.3) in direkter Nachbarschaft zu einem inaktiven Pseudogen (CYP21A1P) [6, 7]. Zusammen mit den Genen für die vierte Komponente des Komplement-Systems (C4A und C4B) befinden sich CYP21A2 und CYP21A1P in einer Tandem-Struktur innerhalb eines HLA (Human Leukocyte Antigen)-Komplexes [8]. CYP21A2 und CYP21A1P sind in 98% der Exons und 96% der Introns homolog zueinander [7, 9]. Das hohe Maß der Homologie zwischen aktivem Gen und Pseudogen sowie die Lokalisation innerhalb des HLA-Komplexes werden als Gründe für die häufigen Mutationen der 21-Hydroxylase angeführt [2, 4]. Rekombinationen zwischen dem aktiven Gen und dem Pseudogen werden als

ursächlicher genetischer Mechanismus für 90% der Mutationen angenommen [6, 10]. Dabei kommt es zur sogenannten Konversion, einem Transfer von aktivitätsmindernden oder inaktivierenden Sequenzen aus dem Pseudogen in das aktive Gen [11]. Spontanmutationen betreffen 1-2% der Allele [1, 12]. Die meisten Patienten sind sogenannte „compound heterozygotes“, d.h. sie tragen mehr als eine Mutation auf den beiden Allelen [13]. Besonders bei schweren und milden Mutationen besteht eine hohe Korrelation zwischen Geno- und Phänotyp [13].

Mangelnde enzymatische Aktivität der 21-Hydroxylase führt zu einem Block in der adrenalen Steroidbiosynthese. Dadurch kommt es zu einem teilweisen oder vollständigen Mangel an Cortisol, bei schweren Enzymdefekten auch an Aldosteron. Kompensatorisch werden das Corticotropin Releasing Hormone (CRH) sowie das adrenocorticotrope Hormon (ACTH) ausgeschüttet, die in der Nebenniere zu einem Exzess an Glukokortikoidvorläufern wie 17-Hydroxyprogesteron (17-OHP) sowie adrenalen Androgenen führen [1]. Man geht davon aus, dass eine chronische Stimulation mit ACTH zu hyperplastischen Veränderungen der Nebennieren führt. So sind erhöhte Volumina der Nebennieren und erhöhte Inzidenzen adrenaler Adenome bei Patienten mit klassischem AGS nachgewiesen [14, 15]. Ebenso existieren Hinweise dafür, dass der Defekt der 21-Hydroxylase auch Effekte auf das Nebennierenmark hat und dort die Adrenalin synthese beeinträchtigt [16]. Ein bedeutender pathophysiologischer Faktor ist die bei AGS durchgeführte Mineralo- und Glukokortikoidersatztherapie. Iatrogenen Hypercortisolismus kann Einschränkungen des Längenwachstums, der Knochendichte, der Fertilität, sowie das metabolische Syndrom bei Patienten mit AGS verursachen [17].

1.2. Klinisches Bild, Diagnose, Therapie und Komplikationen

Das klinische Bild bei Patienten mit AGS wird bestimmt vom Ausmaß des Enzymdefekts. Beim „simple virilising“-Typ der klassischen Form sind ein ausgeprägter Cortisolmangel bei gleichzeitigem Androgenexzess klinisch führend. Beim „salt-wasting“-Typ kommen durch Aldosteronmangel bedingte Symptome hinzu. Dabei sind zwischen dem „simple virilising“-Typ und dem „salt wasting“-Typ in Abhängigkeit vom Ausmaß des Enzymdefekts fließende Übergänge möglich. Die nicht-klassische Form des AGS wird bestimmt von überschießender adrenaler Androgenproduktion, Zeichen eines Cortisol- oder Aldosteronmangels sind in der Regel nicht vorhanden [18].

Pränatal erhöhte Androgenspiegel bewirken bei Mädchen mit klassischem AGS eine Virilisierung der äußeren Geschlechtsorgane bei Geburt. Die Mädchen fallen durch

Vergrößerung der Klitoris, Verschmelzung der Labien und Vereinigung von Vagina und Urethra zu einem gemeinsamen Urogenitalsinus auf. Die Produktion des Anti-Müller Hormons (AMH) ist jedoch bei diesen Mädchen normal, so dass die internen weiblichen Geschlechtsorgane normal entwickelt sind [19]. Die Virilisierung der externen Genitalien bei Mädchen mit klassischem AGS birgt die Gefahr einer falschen Geschlechtszuordnung, erleichtert jedoch die Diagnosestellung [20]. Knaben mit klassischem AGS haben hingegen bei Geburt meist eine weniger ausgeprägte Symptomatik. Vergrößerungen des Penis oder skrotale Hyperpigmentierung können auf ein AGS hinweisen [1]. In Ländern, in denen das AGS nicht im Neugeborenen Screening enthalten ist, wird daher die Diagnose bei Jungen häufig erst später als bei Mädchen gestellt [20]. Unbehandelte Patienten mit der SW-Form können etwa in der 2. Lebenswoche eine lebensbedrohliche Salzverlustkrise erleiden. Unspezifische Allgemeinsymptome bei einer Salzverlustkrise sind geringer Appetit, Lethargie, Gedeihstörungen und Erbrechen, während Hyponatriämie, Hyperkaliämie und hypovolämischer Schock diagnostisch wegweisend sind [11]. Patienten mit nicht-klassischem AGS zeigen bei Geburt in der Regel keine Symptome und fallen erst in der Kindheit und Adoleszenz durch Zeichen des Androgenexzesses auf, viele bleiben jedoch asymptomatisch [21]. In der Kindheit können verfrühter Wachstumsschub und verfrühte Pubarche auf ein nicht-klassisches AGS hinweisen [21, 22]. Jungen mit nicht-klassischem AGS bleiben in der Adoleszenz häufig klinisch unauffällig, während Mädchen und später erwachsene Frauen unter Hirsutismus (etwa 60%), Oligomenorrhoe (etwa 50%) und Akne (etwa 30%) leiden [22]. Nicht oder nicht suffizient therapierte Patienten mit der einfach virilisierenden Form des AGS können in der Kindheit ebenfalls durch zunehmende Virilisierung und Pseudopubertas praecox auffallen [2, 23].

Die hohe Inzidenz, hohe Morbidität und Mortalität bei Nichtbehandlung, die Verfügbarkeit adäquater Screening-Tests sowie eine einfache Therapiemöglichkeit machen das AGS zu einer Erkrankung, die gut für Neugeborenen Screening-Programme geeignet ist [24, 25]. In Deutschland ist das AGS seit 2005 im Neugeborenen Screening enthalten. Neugeborene werden am 3. Lebenstag per Fersenpunktion und Filterpapieranalyse von Vollblut auf erhöhte Spiegel von 17-OHP geprüft [25, 26].

Bei Kindern und Erwachsenen wird zur Primärdiagnostik der morgendliche 17-OHP Spiegel im Serum bestimmt. Zur Abgrenzung gegenüber anderen Enzymdefekten sowie in unklaren Fällen können 21-Desoxycortisol, Androstendion, Testosteron, Plasma-Renin-Aktivität (PRA) und Aldosteron im Blut bestimmt sowie ein ACTH-Stimulationstest mit Bestimmung von 17-OHP, durchgeführt werden. Genetische Untersuchungen sind für weiterhin unklare Fälle und die genetische Beratung geeignet [18].

Die heutige Therapie des AGS hat neben einer Normalisierung der Stoffwechsellage durch Substitution von Gluko- und Mineralokortikoiden auch langfristige Komplikationen im Blick. Um Einschränkungen des Längenwachstums zu minimieren, wird bei Kindern zur Glukokortikoidsubstitution auf das kurzwirksame Hydrocortison zurückgegriffen [4]. Bei Erwachsenen werden dagegen häufiger die langwirksamen Wirkstoffe Prednisolon und Dexamethason verwendet [27]. Mittel der Wahl zur Regulation des Mineralokortikoidhaushalts bei Patienten jeden Alters ist Fludrocortison [17]. Ziel der Therapie ist eine Normalisierung des Androgenhaushalts, während die 17-OHP Spiegel geringfügig erhöht sein sollten [1]. Der Erfolg der Mineralokortikoidtherapie misst sich an einem normwertigen Blutdruck, normwertigen Elektrolyten und normwertigen Renin [28]. Patienten mit nicht-klassischem AGS sollten nur bei Symptomen eines Androgenexzesses und unerfülltem Kinderwunsch mit Glukokortikoiden therapiert werden, bei Frauen können zusätzlich Antiandrogene eingesetzt werden [18, 21]. Körperliche Belastungen, so zum Beispiel Infektionserkrankungen und operative Eingriffe, können von Patienten mit klassischem AGS nicht mit einer adäquaten Steigerung der Kortisolsynthese beantwortet werden. In solchen Fällen wird eine Verdoppelung bis Verdreifachung der Glukokortikoiddosis empfohlen [29]. Ebenfalls sollten alle Patienten mit AGS einen Notfallausweis bei sich tragen [3, 29]. Patienten mit nicht-klassischem AGS benötigen bei körperlichen Belastungen in der Regel keine Erhöhung der Glukokortikoiddosis, im Zweifel kann jedoch ein ACTH-Stimulationstest angezeigt sein, um Einschränkungen der adrenalen Steroidsynthese auszuschließen [18, 21].

Patienten mit AGS haben heutzutage dank frühzeitiger Diagnose und Therapie eine nahezu normale Lebenserwartung, benötigen aber eine lebenslange Therapie mit Gluko- sowie teils Mineralokortikoiden. Daher stehen heute neben der Vermeidung lebensbedrohlicher adrenaler Krisen vor allem Langzeitkomplikationen von Erkrankung und Therapie im Fokus der Aufmerksamkeit. Längenwachstum, metabolische und kardiovaskuläre Komplikationen, Knochendichte und vor allem die Fertilität sind klinische Problemfelder von besonderem Interesse [1, 18].

Das Längenwachstum von Patienten mit AGS ist häufig nicht optimal. Der relative Verlust an Körpergröße wird mit 1,0 bis 1,4 Standardabweichungen beschrieben [30-32]. Eine englische Studie aus dem Jahr 2010 beziffert den absoluten Verlust an Körpergröße mit durchschnittlich 8 cm bei Frauen und durchschnittlich 14 cm bei Männern [33]. Daher wird bei Kindern und Jugendlichen Hydrocortison in einer Dosierung zwischen 10 und 15mg pro m² Körperoberfläche und Tag empfohlen, um die genetische Zielgröße der Patienten möglichst auszuschöpfen [34-36]. Dagegen scheinen höhere Dosierungen und langwirksame Glukokortikoide wie Prednison einen negativen Effekt zu haben [31].

Die lebenslange Therapie mit Glukokortikoiden wirft die Frage auf, inwiefern bei Patienten mit AGS das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen erhöht ist. Während Daten zu kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität rar sind, zeigt sich doch ein erhöhtes kardiovaskuläres Risikoprofil bei Patienten mit AGS. Eine Vielzahl von Studien konnte erhöhte Inzidenzen von Übergewicht und Adipositas, Insulinresistenz und Herzfrequenz zeigen [37-39]. Zusätzlich äußern einige Studien den Verdacht, dass sowohl Kinder als auch erwachsene Patienten mit AGS zu erhöhten Blutdruckwerten neigen [17, 40, 41], so zeigte zum Beispiel eine Studie mit 244 AGS-Patienten bei 2 Dritteln aller erwachsenen Patienten hypertensive Blutdruckwerte [40]. Zwar konnten Arlt *et al.* in einer Studie bei 46% der von ihnen untersuchten Patienten (n=203) erhöhte Cholesterinwerte nachweisen [33], das Fehlen einer Vergleichsgruppe, sowie der allgemein bei diesen Patienten erhöhte Body-Mass Index (BMI) schränken die Übertragbarkeit dieser Untersuchung aber ein. Die Mehrheit der vorhandenen Studien weist nicht auf eine erhöhte Prävalenz von Dyslipidämie bei AGS-Patienten hin [17, 37, 41, 42]. Eine Arbeit konnte bei AGS-Patienten (Alter im Mittel 28 Jahre) eine Vergrößerung der Dicke der Intima media der Femoralarterien, Bauchaorta, Arteriae carotis communes und Bulbi carotici nachweisen, was als Zeichen vorzeitiger Atherosklerose und Surrogatparameter kardiovaskulärer Ereignisse interpretiert wird [43].

Der häufigste Grund einer sekundären Osteoporose ist die Einnahme von Glukokortikoiden [44]. So wurde eine negative Korrelation zwischen kumulativer Glukokortikoiddosis und T-Scores bei Patienten mit AGS gezeigt [45]. Besonders AGS-Patienten älter als 30 Jahre scheinen von Osteopenie und Osteoporose betroffen zu sein [17, 33, 46]. Daneben existieren Hinweise, dass die Knochendichte bei Männern deutlicher gemindert ist als bei Frauen [45, 47, 48].

Die Fertilität ist sowohl bei Frauen als auch bei Männern mit AGS ein besonderes klinisches Problemfeld. Die Zahl der Kinder pro Frau mit klassischem AGS ist deutlich niedriger als die der Durchschnittbevölkerung [33, 49]. Dabei scheinen allerdings diejenigen Frauen, die überhaupt eine Schwangerschaft anstreben, genauso häufig schwanger zu werden wie gesunde Frauen [50]. Postulierte Ursachen für die geminderte Fertilität bei Frauen mit klassischem AGS sind durch Androgenexzess bedingte chronische Anovulation, erhöhte Progesteron-Spiegel, unbefriedigender Geschlechtsverkehr nach feminisierender Genitoplastik und homosexuelle Orientierung [29, 33]. Die Fertilität von Frauen mit nicht-klassischem AGS scheint nur geringgradig reduziert zu sein [51]. Im Gegensatz zu Frauen existieren nahezu keine Daten zur Fertilität von Männern mit nicht-klassischem AGS. Deutlich eingeschränkt ist die Fertilität bei Männern mit klassischem AGS. Bei Männern mit klassischem AGS ist sowohl die Zahl der Kinder pro Mann als auch die Samenqualität verringert [33, 52-54]. In einer schwedischen Studie zeugten Männer mit klassischem AGS im Durchschnitt 0,9 Kinder während die gesunde

Referenzpopulation 1,8 Kinder zeugte [52]. 37% der Männern einer britischen Studie versuchten Kinder zu zeugen, wovon nur 67% erfolgreich waren [33]. Weiterhin zeigten mehrere Studien pathologische Spermioogramme bei den Männern mit klassischem AGS, wobei bis zu 100% der Patienten betroffen waren [52, 53, 55]. Ebenfalls mehrfach beschrieben wurden pathologisch erhöhte Inhibin B- und erniedrigte Testosteronspiegel [19, 53, 55]. Als Ursachen diskutiert werden unter anderem adrenale Androgenexzesse bei mangelnder Therapie mit Glukokortikoiden genauso wie sekundärer Hypogonadismus bei Übertherapie mit Glukokortikoiden [17]. Führender Grund für Fertilitätsminderungen von Männern mit AGS ist die Entwicklung von testikulären adrenalen Resttumoren (TART), die durch mechanische und parakrine Effekte die Hodenfunktion beeinträchtigen können [1, 32, 55]. Veränderungen der sexuellen Orientierung spielen bei Männern mit AGS im Vergleich zu Frauen keine wesentliche Rolle [56].

1.3. Testikuläre und ovarielle adrenale Resttumore

Testikuläre und ovarielle adrenale Resttumore (OART) sind benigne Tumoren, die in Ovar und Hoden lokalisiert sind und histologisch sowie molekularbiologisch Ähnlichkeit mit orthotopem adrenalen Gewebe aufweisen [57]. Die Prävalenz von testikulären adrenalen Resttumoren (TART) wird bei Männern mit klassischem AGS mit bis zu 94% beschrieben [52, 53, 55], teilweise können sie bereits bei Knaben auftreten [58, 59]. OART sind dagegen äußerst selten beschrieben [60, 61]. Es wird davon ausgegangen, dass TART einerseits durch direkte mechanische Schäden am Hodenparenchym, andererseits durch parakrine Sekretion von adrenalen Steroiden die Fertilität der betroffenen Männer einschränken [57]. In der Regel treten sie bilateral auf und sind im rete testis lokalisiert [16]. Man nimmt an, dass TART aus aberranten adrenalen Zellen entstehen, die beim Descensus testis mit dem Hoden verschleppt werden [17, 57]. Es konnte bereits an humanen TART-Präparaten gezeigt werden, dass ACTH-Rezeptoren (Melanocortin-2-Rezeptor (MC2R)), Angiotensin II (ATII)-Rezeptoren sowie Rezeptoren für das luteinisierende Hormon (LH) in TART exprimiert werden [62]. Genauso wurde die Expression der adrenalen Markerenzyme CYP11B1 und CYP11B2 in TART sowie nebennierenspezifische Steroide in den Hodenvenen von TART-Patienten nachgewiesen [62]. Eine schlechte hormonelle Therapieeinstellung beim AGS mit erhöhten 17-OHP- und ACTH-Spiegeln wird mit dem Auftreten und Wachstum von TART assoziiert [33]. Unter intensiver Glukokortikoidtherapie kann eine Größenreduktion der Tumoren erreicht werden [57]. Teilweise können TART jedoch auch bei adäquat therapierten Patienten mit niedrigen ACTH-

Spiegeln auftreten [63]. Weiterhin sind die Daten zur Korrelation von laborchemischen Kontrollparametern des AGS zu Größe und Auftreten von TART nicht eindeutig. Reisch *et al.* sahen keine Korrelation zwischen Androstendion, morgendlichem 17-OHP, Pregnantriol (Urin) und dem Volumen von TART [14], während Nermoen *et al.* signifikant höhere Werte von 17-OHP, ACTH, und Androstendion bei Auftreten von TART beobachteten [15].

1.4. 21-Hydroxylase Defizienz im Mausmodell

Zur Untersuchung der 21-Hydroxylase Defizienz im Mausmodell wird der H-2^{aw18} (aw18) genannte Mausstamm verwendet [64-68]. Der Stamm der aw18-Mäuse ist charakterisiert durch eine Deletion im Gen für die Komponente C4 des Komplementsystems sowie eine Deletion im aktiven, murinen Gen für die 21-Hydroxylase CYP21A1 [64, 65]. Bei der Maus wurde als der diese Mutation verursachenden Mechanismus das sogenannte „unequal crossing-over“ identifiziert [65]. Dabei wird ein Abschnitt aus dem inaktiven murinen Pseudogen CYP21A2-P in das aktive murine Gen CYP21A1 transferiert [65]. Dabei kommt es zur Deletion eines 80kb langen Abschnitts im Gen CYP21A1 sowie im Gen von C4 [65]. Dieser Mechanismus wird auch als Konversion bezeichnet und ähnelt dem beim Menschen. Analog zur Lokalisation beim Menschen befinden sich die murinen Gene für CYP21A1, CYP21A2-P sowie C4, dessen inaktive Variante Slp (Sex-limited protein) und Faktor B in der Klasse III Region des MHC-Komplexes (Major Histocompatibility Complex), einer genetisch instabilen Region [64]. Ebenso wie beim Menschen wird die 21-Hydroxylase Defizienz bei der Maus autosomal-rezessiv vererbt [64]. Aw18-homozygote Mäuse sterben spätestens an Tag 15 post partum [64, 65]. Als Ursache wird die durch die 21-Hydroxylase Defizienz bedingte Nebenniereninsuffizienz angenommen. Aw18-homozygote Mäuse können mit Corticosteron am Leben gehalten werden [66].

Die adrenale und testikuläre Steroidsynthese bei 21-Hydroxylase defizienten Mäusen wird in Abbildung 1 gezeigt (nach [68-71]). 21OHD-Mäuse sind, wie in Abbildung 1 dargestellt, nicht in der Lage Corticosteron oder Aldosteron zu synthetisieren. Neben erniedrigten Corticosteronspiegeln sind für aw18-Mäuse auch erhöhte Progesteron- und erniedrigte Adrenalin- und Noradrenalin-Spiegel nachgewiesen [68]. Die Androgensynthese, die bei allen Mäusen ab dem Gestationsalter E16.5 auf den Hoden beschränkt ist [69, 70], ist von der 21-Hydroxylase Defizienz nicht beeinträchtigt. Abbildung 2 fasst die systemischen Auswirkungen der 21-Hydroxylase Defizienz zusammen (nach [68, 72]). Neben dem bereits erwähnten Mangel an Corticosteron und Aldosteron kommt es konsekutiv zu einem Anstieg des vom

Hypothalamus ausgeschütteten CRH sowie des von der Hypophyse ausgeschütteten ACTH, das trophische Wirkung auf die Nebenniere entfaltet [72, 73]. So sind für aw18-homozygote Mäuse hyperplastische Veränderungen und Unregelmäßigkeiten in der histologischen Architektur der Nebennieren beschrieben worden [67, 68].

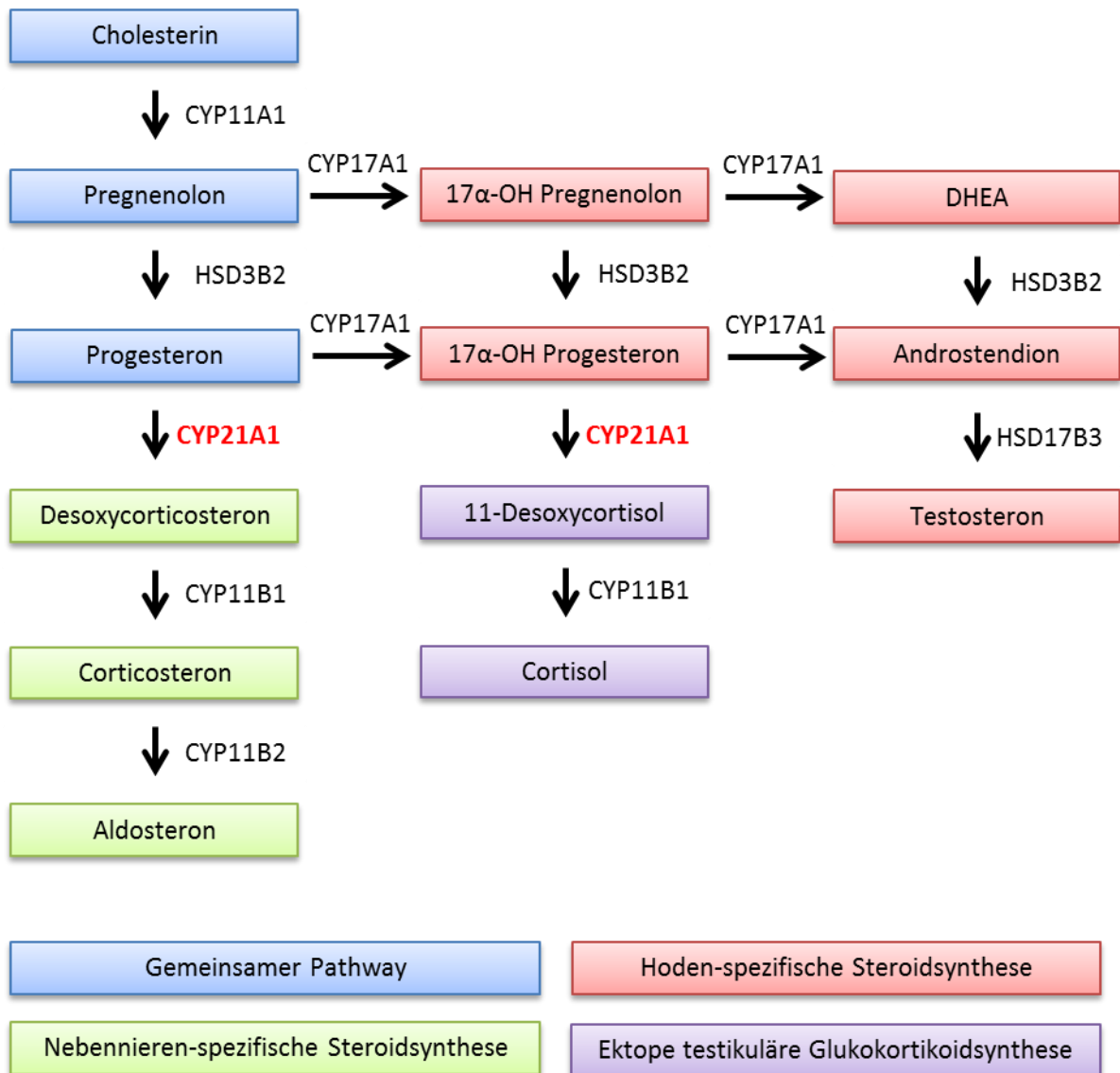


Abb. 1: Adrenale und testikuläre Steroidsynthese bei 21OHD-Mäusen

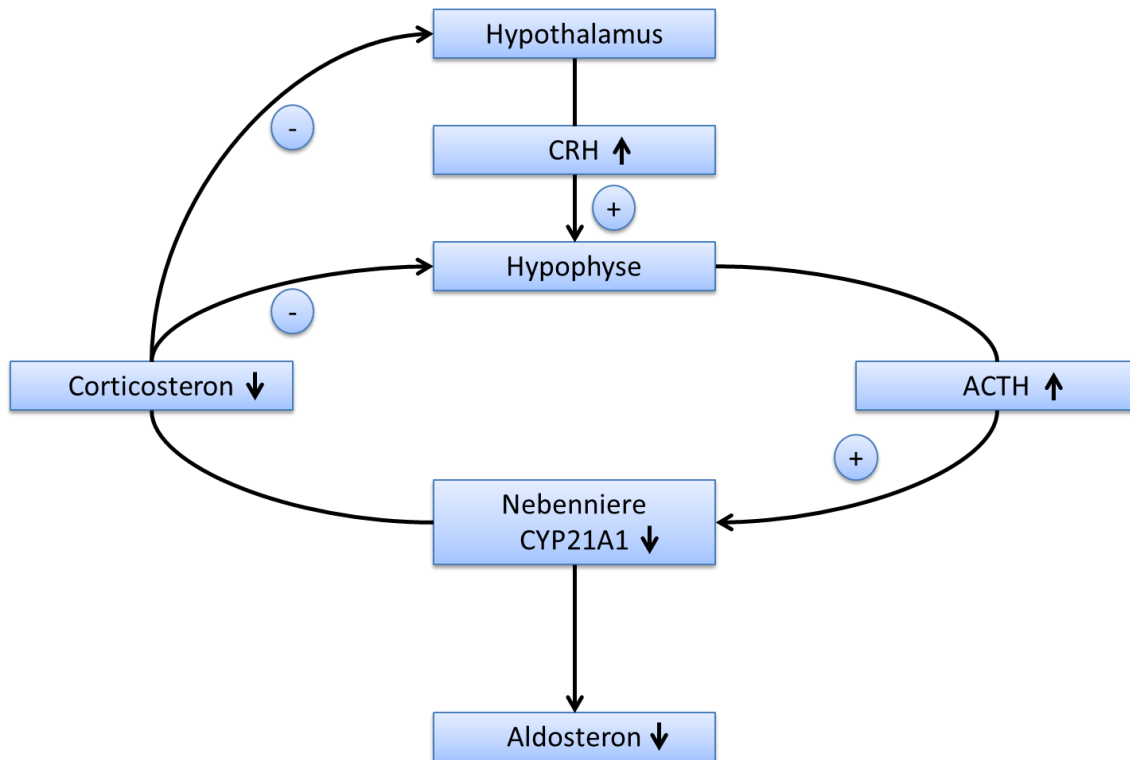


Abb. 2: Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse bei 21OHD-Mäusen

1.5. Adrenale und testikuläre Markergene

Im folgenden Abschnitt werden Markergene beschrieben, die jeweils für die adrenale und testikuläre Steroidsynthese sowie für Leydig-Zellen spezifisch sind. Die Bestimmung ihrer Expressionsniveaus ist wesentlich, um die Zugehörigkeit der Zellen zu testikulärem oder adrenalem Gewebe zu bestimmen. Abbildung 3 zeigt eine Übersicht der beschriebenen Markergene.

1.5.1. CYP21A1

CYP21A1 kodiert bei Mäusen für die 21-Hydroxylase und wird klassischerweise als nebennierenspezifisch bezeichnet. Für fetale und adulte Mäuse konnte jedoch die Expression von CYP21A1 in testikulärem Gewebe nachgewiesen werden [75, 76]. Die 21-Hydroxylase katalysiert bei Mäusen in der Steroidbiosynthese die Reaktion von Progesteron zu Desoxycorticosteron [62]. Mäuse ohne 21-Hydroxylase-Aktivität sind nicht in der Lage Corticosteron zu produzieren, zeigen aber angesichts der fehlenden adrenalen Expression von CYP17A1 keine Androgenexzesse [62].

1.5.2. *CYP11B1*

CYP11B1 kodiert für die 11 β -Hydroxylase und wird ebenso wie CYP21A1 als nebennierenspezifisch betrachtet. Genauso existieren aber auch Nachweise für die Expression von CYP11B1 in fetalem und neonatalem testikulären Gewebe [75, 76]

1.5.3. *CYP11B2*

CYP11B2 enthält die genetische Information für die Aldosteron-Synthase, die die Umwandlung von Desoxycorticosteron zu Aldosteron katalysiert [86]. CYP11B2 ist ein nebennierenspezifisch exprimiertes Gen.

1.5.4. *MC2R*

Der Melanocortin-2-Rezeptor (MC2R) wird vom Gen MC2R kodiert und ist Rezeptor für das Hormon ACTH. Bindung von ACTH an MC2R resultiert in Stimulation der Steroidbiosynthese [87]. MC2R wird bei fetalen Mäusen des Gestationsalters E18.5 sowohl in der Nebenniere als auch im Hoden exprimiert [88]. Bei fetalen Mäusen konnte zum Gestationsalter E18.5 die Expression von MC2R in den Spermatogonien sowie einigen mesenchymalen Zellen lokalisiert werden [88].

1.5.5. *CYP11A1*

Das Gen CYP11A1 kodiert die Information für das sogenannte Cholesterol Side-Chain Cleavage Enzyme P450_{scc} [89]. P450_{scc} katalysiert den ersten Schritt der Steroidbiosynthese, die Reaktion von Cholesterin zu Pregnenolon und wird sowohl in Nebennieren als auch in Hoden exprimiert [89]. Ein Verlust der Expression von CYP11A1 resultiert im Verlust jeglicher Steroidsynthese [31].

1.5.6. *CYP17A1*

CYP17A1 kodiert die genetische Information für die 17 α -Hydroxylase und ist essentiell für die testikuläre Synthese von Androgenen bei Mäusen [90]. CYP17A1 wird bei Mäusen charakteristischerweise in Leydig-Zellen, nicht aber in Nebennieren exprimiert [70, 91]

1.5.7. *INSL3*

Insulin-like factor 3 (*INSL3*) ist ein von Leydig-Zellen sezerniertes Peptid, dem entscheidende Bedeutung bei der intraabdominellen Phase des Descensus testis zugesprochen wird. Sein Rezeptor *RXFP2* wird in hohen Maßen im Gubernaculum von Mäusen exprimiert [92]. Mutationen im Gen von *INSL3* oder *RXFP2* resultieren bei Mäusen in primärem Kryptorchismus [93, 94]. Daneben wurde ein stimulatorischer Effekt von *INSL3* auf die Testosteron-Sekretion von Leydig-Zellen nachgewiesen [95]. Neben Leydig-Zellen exprimieren bei der Maus auch Luteal-Zellen *INSL3* [92].

1.5.8. *AMH*

Das Anti-Müller-Hormon (*AMH*) ist ein bei männlichen Feten von den Sertoli-Zellen sezerniertes Glykoprotein, das die Regression des Müller-Gangs bewirkt [96]. Ebenso scheint *AMH* einen Effekt auf die Leydig-Zell-Differenzierung zu haben [97].

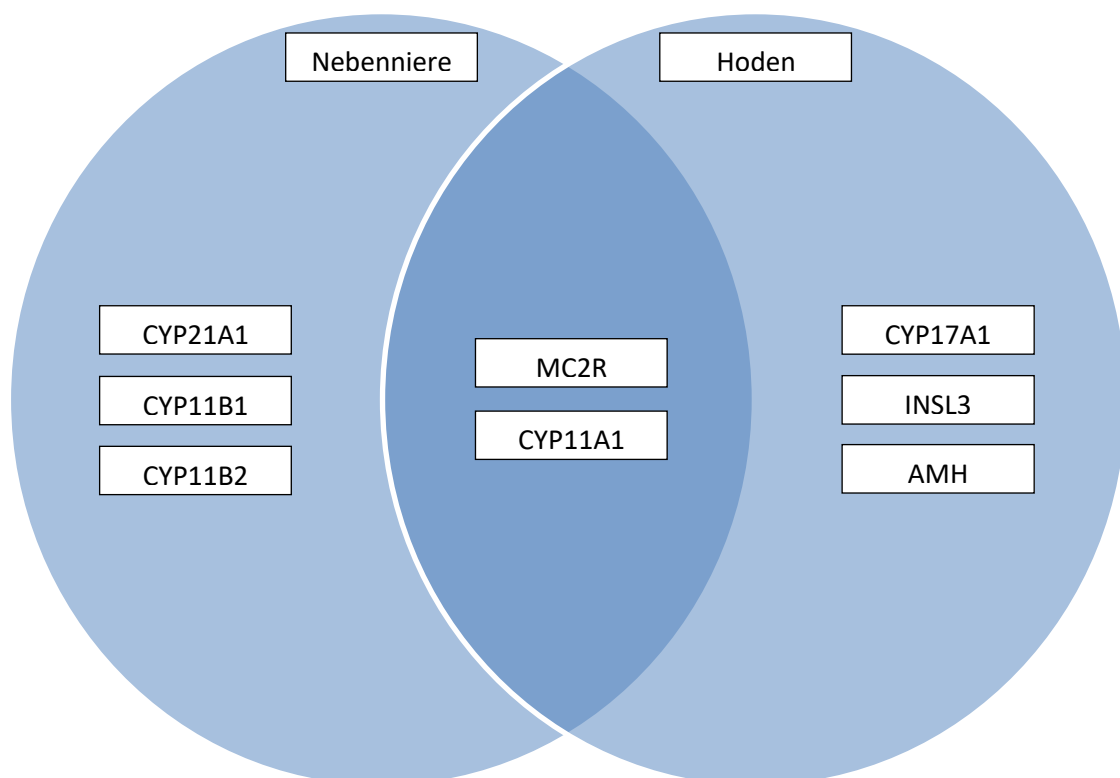


Abb. 3: Schematische Darstellung der Organspezifität typischer adrenaler und testikulärer Markergene

1.6. Vorerkenntnisse zur Entwicklung testikulärer und adrenaler Resttumore im Mausmodell

Zur Entwicklung testikulärer adrenaler Resttumore im Mausmodell ist in der Literatur wenig beschrieben. Grundsätzlich existiert keine Arbeit, die das Auftreten von TART oder OART bei adulten Mäusen beschreibt. In den bisher zu gonadalen adrenalen Resttumoren bei Mäusen veröffentlichten Arbeiten liegt der Fokus auf der Untersuchung bestimmter testikulärer Zelltypen bei fetalen und neonatalen Mäusen, die als Ursprung der Entwicklung dieser Tumore vermutet werden.

1.5.1 Gemeinsamer embryonaler Ursprung von Nebenniere und Hoden

Expressionsstudien von SF-1 (steroidogenic tissue-specific transcription factor 1) bei der Maus konnten zeigen, dass Nebenniere und Gonaden einen gemeinsamen Ursprung in der Embryonalentwicklung haben [74]. Weitere Arbeiten konnten zeigen, dass interstitielle testikuläre Zellen von fetalen und neonatalen Mäusen MC2R, CYP11B1 und CYP21A1 exprimieren [75, 76]. Die Expression dieser Gene wird normalerweise als nebennierentypisch betrachtet. Während CYP11B1 und MC2R spätestens ab dem 10. Lebensstag der Mäuse nicht mehr nachweisbar sind [75, 76], ist CYP21A1 auf geringem Niveau auch bei adulten Tieren exprimiert [76].

1.5.2 „Adrenal-like cells“

Val *et al.* beschrieben 2006 sogenannte „adrenal-like cells“, interstitielle Zellen im fetalen Maushoden, die die nebennierenspezifischen Gene CYP11B1 und CYP21A1 exprimieren [77]. Genauso ist bei diesen Zellen CYP17A1 exprimiert, ein typischerweise im Hoden exprimiertes Gen der Androgensynthese [77]. Durch das Fehlen des Leydig-Zell spezifischen Markers INSL3 (Insulin-like 3) unterscheiden diese Zellen sich aber von den ebenfalls im testikulären Interstitium vorkommenden Leydig-Zellen [77]. Val *et al.* untersuchten diese adrenal-like cells nicht auf das Vorhandensein von Rezeptoren für Angiotensin II. Ebenso beobachteten Val *et al.*, dass während der Embryogenese steroidproduzierende Zellen vom Mesonephros in den embryonalen Hoden gelangten und mit diesem deszendierten [77]. Die adrenal-like cells haben also sowohl typische Eigenschaften von Leydig- wie auch von adrenalen Zellen und können als Ursprung der späteren Entwicklung von TART vermutet werden.

1.5.3 Stimulationsexperimente von Maushoden mit ACTH oder HCG

Es konnte gezeigt werden, dass *in vitro* die Stimulation von fetalen und neonatalen Maushoden sowohl mit HCG (humanes Choriogonadotropin) als auch mit ACTH zu signifikanter Steigerung der Testosteronsynthese führt [75, 78]. Gleichzeitige Stimulation mit ACTH und HCG hat keinen additiven Effekt und führt zu keiner Erhöhung der Testosteron-Synthese im Vergleich zu bloßer Stimulation mit HCG bzw. ACTH [78].

Val *et al.* konnten mit fetalen Maushoden des Gestationsalters E14.5 per Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung zeigen, dass die *in vitro* Inkubation mit ACTH oder HCG bei diesen Organen die Expression von CYP11B1 induziert [77]. Bei einer weiteren Untersuchung mit neonatalen Maushoden führte dagegen die *in vitro* Stimulation mit ACTH bzw. HCG nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Menge an mRNA (messenger-Ribonukleinsäure) von CYP11B1 oder CYP21A1 [76]. Hu *et al.* konnten zeigen, dass bei CYP11A1 defizienten, neonatalen Mäusen CYP21A1 in interstitiellen Hodenzellen exprimiert wird [79]. Eine tagesgenaue Altersangabe der untersuchten Mäuse machten die zuletzt genannten Autoren nicht. Bis jetzt existieren damit zahlreiche Hinweise, dass Nebennieren und Hoden in der Embryogenese aus demselben Ursprung entstehen. Genauso existieren Hinweise dafür, dass während der Embryogenese Zellen mit adrenalen Eigenschaften mit dem Hoden deszendieren können und zumindest teilweise durch ACTH stimulierbar sind. Es stellt sich die Frage, welchen Einfluss das Alter, die lokale Nische und systemische Faktoren auf das Verhalten dieser nebennierenähnlichen Zellen im Hoden haben. Genauso ist unklar, ob adrenale Resttumore auch unabhängig von trophischen Faktoren wie ACTH wachsen können. Besonders muss die Frage beantwortet werden, inwieweit eine Verbindung zwischen diesen nebennierenähnlichen Zellen bei der fetalen und neonatalen Maus und dem Auftreten von TART beim Menschen hergestellt werden kann.

1.7. Intention dieser Arbeit

In den bisher veröffentlichten Arbeiten wurde das Verhalten nebennierenähnlicher Zellen oder adrenaler Markerenzyme im Hoden nur *in vitro* und nicht *in vivo* sowie nicht bei 21-Hydroxylase defizienten Tieren untersucht. Daher beschäftigt sich diese Arbeit nun mit der Frage, ob es bei 21-Hydroxylase defizienten fetalen Mäusen zu quantitativen Veränderungen der Expression adrenaler Markerenzyme im Hoden kommt. Dazu sollen Mäusefeten des Gestationsalters E18.5 untersucht werden. Veränderungen der Expressionsniveaus adrenaler

Markerenzyme sollen dann zur Erklärung der Pathogenese testikulärer adrenaler Resttumore herangezogen werden.

2. Material und Methoden

2.1. Tierzucht, timed pregnancy studies und Gewebebegewinnung

Sämtliches für die Untersuchungen dieser Arbeit verwendetes Gewebe stammt von Mäusen des Stammes H-2^{aw18} (aw18). Der Genotyp aw18-homozygoter Mäuse wurde als aw18/aw18, der Genotyp aw18-heterozygoter Mäuse als aw18/b, der Genotyp von Wildtyp-Mäusen als b/b bezeichnet. Die Tiere wurden in Übereinstimmung mit aktuellen Tierschutzrichtlinien in Käfigen der Größe 20x40x15 cm bzw. 30x45x18 cm gehalten. Die Mäuse hatten Zugang zu Wasser und Nahrung ad libitum, die Tagesrhythmik bestand aus einem 12-Stunden Hell- und 12-Stunden Dunkelzyklus mit Beginn des Hellzyklus um 6 Uhr.

Im Alter von 4 Wochen wurde den Mäusen zur Bestimmung des Genotyps eine Schwanzbiopsie entnommen. Die Mäuse wurden mit dem Narkosegas Isofluran narkotisiert, bevor ihnen ein ca. 5mm langes Stück des Schwanzes per Skalpell entfernt wurde. Danach wurden die Schnittflächen an den Schwanzenden mit Enbucrilat versorgt (Histoacryl® Gewebekleber, B. Braun Petzold GmbH). Enbucrilat polymerisiert in Anwesenheit von Gewebsflüssigkeit zu einem festen Film, der die Wunde verschließt. Anschließend wurden die Mausschwanzbiopsien zur Extraktion der Maus-Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Charakterisierung des jeweiligen Genotyps verwendet (siehe Kapitel 2.2.).

Ein Teil des Mausstammes wurde zu sogenannten „timed pregnancy studies“ [80] herangezogen. Das Vorgehen hierbei erfolgte nach etablierten Protokollen [80-82]. Im Alter von mindestens 8 Wochen wurden die geschlechtsreifen Mäuse entsprechend ihres Genotyps zwischen 17.00 und 18.00 Uhr verpaart. Anschließend wurden jeden Morgen zwischen 6.00 und 8.00 Uhr die weiblichen Mäuse auf postkoitale Ejakulationsplugs am ostium vaginae untersucht. Der Morgen, an dem ein solcher Plug festgestellt wurde, wurde als Gestationstag E0.5 definiert. Am Gestationstag E18.5 wurden den trächtigen Weibchen dann die Feten zur weiteren Präparation und Untersuchung entnommen. Die trächtigen Weibchen wurden dabei mit Isofluran narkotisiert und anschließend per Dekapitation getötet. Nach Desinfektion des Abdomen mit 70% Ethanol, sowie Haut- und Peritonealschnitt konnte der Uterus und damit

auch die Feten entnommen werden. Anschließend wurden die Mäusefeten ebenfalls dekapitiert. Nach erfolgter Dekapitation konnten die Feten in sterilem PBS (Phosphate buffered saline) zwischengelagert werden. Mit Hilfe eines Stereomikroskops und sehr feinem, mausgeeignetem Präparierbesteck wurden den männlichen Feten Leber, Nebennieren und Hoden entnommen. Weibliche Feten wurden nicht zur Untersuchung herangezogen.

Die entnommenen Lebern wurden sofort bei -80°C in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und dann zur DNA-Extraktion herangezogen (siehe Kapitel 2.2.). Von den paarigen Nebennieren und Hoden wurde je ein Organ umgehend für die spätere Ribonukleinsäure (RNA)-Extraktion (siehe Kapitel 2.3.) in RNA-Later® Lösung (Ambion®) eingelegt und bei 4°C gelagert, das andere für histologische Untersuchungen aufbereitet. Das Vorgehen bei der Aufbereitung von Nebennieren und Hoden für die spätere histologische Untersuchung wird in Tabelle 1 für die Nebennieren und in Tabelle 2 für die Hoden zusammengefasst und im folgenden Abschnitt beschrieben.

Nebennieren und Hoden, die für die spätere histologische Untersuchung (siehe Kapitel 2.6. und 2.7.) in Frage kamen, wurden für die Dauer der Präparation in sterilem PBS gelagert. Anschließend wurden die entnommenen Nebennieren für je eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) in 4% Paraformaldehyd (PFA) (Tab. 1, Schritt 1), 30% Ethanol (Tab. 1, Schritt 2), 50% Ethanol (Tab. 1, Schritt 3) und 70% Ethanol dehydriert (Tab.1, Schritt 4). Hoden wurden nach Entnahme für 24 Stunden in Bouin's fixative eingelegt (Tab. 2, Schritt 1), bevor sie in 70% Ethanol (Tab.2, Schritt 2) gelagert wurden. Zwischen den einzelnen Dehydrierungsschritten war auf ein kurzes Waschen in sterilem PBS zu achten. Organe, die sich in 70% Ethanol befanden, konnten bei 4°C auch längere Zeit aufbewahrt werden. Anschließend wurden alle Organe maschinell mit Hilfe des sogenannten STP120 HistoCyclers (Microm) jeweils zweimal eine Stunde in 70% Ethanol (Tab. 1, Schritte 5 und 6 bzw. Tab. 2, Schritte 3 und 4), einmal zwei Stunden in 70% Ethanol (Tab. 1, Schritt 7 bzw. Tab. 2, Schritt 5), zweimal 2 Stunden in 96% Ethanol (Tab. 1, Schritte 8 und 9 bzw. Tab. 2, Schritte 6 und 7), eine Stunde in 100% Ethanol (Tab. 1, Schritt 10 bzw. Tab. 2, Schritt 8), zweimal 2 Stunden in 100% Ethanol (Tab. 1, Schritte 11 und 12 bzw. Tab. 2, Schritte 9 und 10), zweimal 2 Stunden in Xylol (Tab. 1, Schritte 13 und 14 bzw. Tab. 2, Schritte 11 und 12), sowie 2 und 7 Stunden in flüssigem Paraffin dehydriert (Tab. 1, Schritte 15 und 16 bzw. Tab. 2, Schritte 13 und 14).

Manuelle Dehydrierung

Schritt	Reagenz	Dauer
1	4% PFA	1h
2	30% Ethanol	1h
3	50% Ethanol	1h
4	70% Ethanol	1h- mehrere Tage

Maschinelle Dehydrierung

Schritt	Reagenz	Dauer
5	70% Ethanol	1h
6	70% Ethanol	1h
7	70% Ethanol	2h
8	96% Ethanol	2h
9	96% Ethanol	2h
10	100% Ethanol	1h
11	100% Ethanol	2h
12	100% Ethanol	2h
13	Xylol	2h
14	Xylol	2h
15	Paraffin	2h
16	Paraffin	7h

Tabelle 1: Dehydrierung von fetalen Nebennieren (E18.5)

Manuelle Dehydrierung

Schritt	Reagenz	Dauer
1	Bouin's fixative	ca. 24h
2	70% Ethanol	1h- mehrere Tage

Maschinelle Dehydrierung

Schritt	Reagenz	Dauer
3	70% Ethanol	1h
4	70% Ethanol	1h
5	70% Ethanol	2h
6	96% Ethanol	2h

Tabelle 2: Dehydrierung von fetalen Hoden (E18.5)

Schritt	Reagenz	Dauer
7	96% Ethanol	2h
8	100% Ethanol	1h
9	100% Ethanol	2h
10	100% Ethanol	2h
11	Xylol	2h
12	Xylol	2h
13	Paraffin	2h
14	Paraffin	7h

Tabelle 2: Dehydrierung von fetalen Hoden (E18.5)

Nach Abschluss der Dehydrierungsschritte wurden die Organe in flüssiges Paraffin eingelegt, das anschließend bei Raumtemperatur aushärtete. Nach Aushärtung des Paraffins wurden die Gewebeproben per Mikrotom in 7µm Sagittalschnitte geschnitten und auf Objektträgern fixiert.

2.2. Genotypisierung

Zur Genotypisierung der Mäuse wurden bei adulten Tieren Mausschwanzspitzen und bei fetalen Tieren Lebergewebe verwendet. Beide Gewebetypen wurden nach demselben Verfahren behandelt. Die DNA wurde zunächst aus den Geweben extrahiert, dann per Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert und schließlich per Gelelektrophorese analysiert.

2.2.1. DNA-Extraktion

Zunächst wurden die Gewebe mit 600µl an zuvor in der Mikrowelle erwärmten TNES-Puffer (10mM Trishydroxymethylaminomethan (Tris)-HCl, 1mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 150mM NaCl, 0,5% Sodium dodecyl sulfate (SDS)) sowie 35µl Proteinase K (10 mg/ml) bei 55°C für 12 Stunden inkubiert. Zu den so entstandenen Lösungen wurden 170µl 6M NaCl sowie 100µl Phenol-Chloroform (Chloroform: Isoamylalkohol 24:1) hinzupipettiert. Danach mussten die Reaktionsansätze in den Tubes durch kräftiges Schütteln gut durchmischt werden. Nach 5-minütiger Zentrifugation bei 13000 U/min und Raumtemperatur wurden 700µl des nun entstandenen Überstands abpipettiert. Dem Überstand wurden weitere 700µl zuvor bei -20°C gekühlten 95% Ethanols hinzugegeben, das jetzt ausfallende, die DNA enthaltende Präzipitat

wurde dann mit einer Pasteurpipette aufgefädelt. Die dazu verwendeten Pasteurpipetten mussten zuvor mit dem Bunsenbrenner verschlossen werden. Die Pipette mit der DNA wurde kurz in 70% Ethanol gereinigt, dann 5 bis 10 Minuten luftgetrocknet. Schließlich wurde die DNA in 50-100µl Tris-EDTA-Puffer (10mM Tris, pH 8,0, 1mM EDTA) resuspendiert und auf 65°C erhitzt. Anschließend erfolgte die DNA-Konzentrationsbestimmung mittels NanoDrop (Thermo Scientific). Die weitere Lagerung der Proben erfolgte bei 4°C.

2.2.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte, die auf der DNA-Synthese-Aktivität thermostabiler DNA-Polymerasen beruht [83]. Hier wurde zur Vervielfältigung der zuvor gewonnenen murinen DNA das GoTaq®-Kit (Promega) verwendet. Pro zu analysierender DNA-Probe wurden 4µl GoTaq®-Puffer, 0,4µl dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphat)-Lösung, 0,5µl des Forward-Primers, 0,5µl des Reverse-Primers, 13,75µl destilliertes Wasser (aqua dest.), 0,25µl GoTaq®-Polymerase-Lösung, sowie 1µl der zu analysierenden DNA-Probe in ein PCR-geeignetes Tube gegeben. Die Sequenz und Produktlänge des hier verwendeten Forward- sowie des Reverse-Primers (aw18) werden in Tabelle 3 aufgelistet. Die Tubes wurden nach Pipettieren des Reaktionsansatzes wenige Sekunden mit der peqlab Combi-Spin Tischzentrifuge zentrifugiert und in die peqlab Primus25 PCR-Maschine gegeben. Dort wurden sie automatisiert auf unterschiedliche Temperaturstufen erhitzt, um die DNA-Amplifikation über die Schritte Denaturierung, Annealing und Amplifikation zu ermöglichen. Im Rahmen dieses automatischen Programmes wurden die Proben initial zur Denaturierung für 2 Minuten auf 95°C erhitzt. Dem schlossen sich 40 Zyklen aus 30 Sekunden Denaturierung bei 95°C, 30 Sekunden Annealing bei 55°C und 30 Sekunden Elongation bei 72°C an. Nach diesen Zyklen wurde die Temperatur für 5 Minuten auf 72°C gehalten bevor die Proben auf 8°C gekühlt wurden. Das Programm endete bei Erreichen von 8°C. Langfristig konnte die so amplifizierte DNA dann bei 4°C gelagert werden.

Primerpaar	aw18
Sequenz des Forward-Primers	ACTCAGGACTCAGAATGAAGATCC
Sequenz des Reverse-Primers	ATTCCTAGATGAAAAGTCTGTGGC
Länge des PCR-Produkts	120bp

Tabelle 3: Zur Genotypisierung verwendete Primer

2.2.3. Agarose-Gelelektrophorese mit DNA

Die Agarose-Gelelektrophorese mit DNA ist ein Verfahren, das die unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten unterschiedlich großer DNA-Fragmente in Agarose-Gel ausnutzt und die DNA-Fragmente der Länge nach auftrennt. Zunächst wurde ein 4%-Agarose-Gel durch Lösung von Agarose-Pulver in TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer, anschließendem Aufkochen des Gemischs und Hinzugabe von 5ppm Ethidiumbromid erzeugt und in einen Gelelektrophorese-Schlitten gegossen. Nach Erkaltung und Polymerisierung des Gels konnte das Gel in ein mit TBE-Puffer gefülltes Elektrophorese-Bad gegeben werden. Mindestens eine der Taschen im Gel wurde mit 5µl der Fermentas GeneRuler™ low range DNA ladder, die anderen mit 10µl der zuvor amplifizierten DNA beladen. Als Standard wurden je eine Tasche mit DNA einer bekannt homozygoten (aw18/aw18), eine Tasche mit DNA einer bekannt heterozygoten (aw18/b) und eine Tasche mit DNA einer Wildtyp-Maus (b/b) beladen. Nach einer Laufzeit von 180 Minuten bei einer angelegten Spannung von 70V konnte das Gel aus dem Elektrophorese-Bad entnommen, unter UV (Ultraviolett)-Licht fotografiert und analysiert werden. Das dem Gel hinzugegebene Ethidiumbromid interkaliert mit DNA und fluoresziert unter UV-Licht, was die Visualisierung der DNA enthaltenden Lösungen im Gel ermöglicht. Daneben enthält die DNA-Leiter DNA-Abschnitte bekannter Länge, die die vergleichende Einordnung der Längen der amplifizierten DNA-Abschnitte im Gel erlauben.

2.3. RNA-Extraktion

Zur Gewinnung der RNA aus den zuvor präparierten und in RNA-Later® gelagerten Organen wurde das Quiagen RNeasy® Micro-Kit verwendet. Vor Beginn der RNA-Extraktion wurden sämtliche Arbeitsflächen und Instrumente mit RNase-Inhibitor haltigen Ambion® RNase Zap Wipes gereinigt. Die folgenden Arbeitsschritte fanden bei Raumtemperatur statt. Die Bezeichnungen „Buffer RLT“, „Buffer RPE“, „DNase I Stock Solution“, „RNeasy MinElute Spin Column“, „Collection Tube“, „Buffer RDD“ und „Buffer RW 1“ sind Bezeichnungen, die vom Hersteller des Kits für die mitgelieferten Reagenzien und Materialien verwendet werden.

Zunächst wurden 10µl β-Mercaptoethanol in 1ml Buffer RLT pipettiert und Buffer RPE mit 100% Ethanol im Verhältnis 1:5 verdünnt. Zusätzlich wurde DNase I Stock Solution durch Lösen von lyophilisierter DNase I in 550µl destilliertem Wasser hergestellt. Die fetalen Nebennieren und Hoden wurden der RNA-Later®-Lösung entnommen und in 350µl Buffer RLT mit Hilfe des Quiagen TissueLyser LT für 2 Minuten bei 20Hz homogenisiert. Für eine gleichmäßige

Homogenisierung wurden nach den ersten 2 Minuten Homogenisierung die Positionen der Tubes im TissueLyser LT geändert: Die Positionen der Tubes, die sich während den ersten 2 Minuten Homogenisierung nahe an der Rotationsachse des Homogenisierungsgeräts befanden, wurden mit der Position der Tubes getauscht, die sich während den ersten 2 Minuten rotationsachsenfern befanden. Nach diesem Positionswechsel wurde erneut für 2 Minuten bei 20 Hz homogenisiert. Anschließend wurden die Tubes für 3 Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert, der entstandene Überstand abpipettiert und in ein frisches Tube gegeben. Dem wurden 350µl 70% Ethanol hinzugegeben. Die Proben wurde nun auf eine RNeasy MinElute Spin Column in einem 2ml Collection Tube transferriert und für 15 Sekunden bei 13000 U/min zentrifugiert. Danach wurde der im Collection Tube angesammelte Durchfluss verworfen. Jetzt wurden 10µl DNase I Stock solution zu 70µl Buffer RDD pipettiert und das entstandene Gemisch über die RNeasy MinElute Spin Columns gegeben. Dem schlossen sich 15 Minuten Inkubation der RNeasy MinElute Spin Columns bei Raumtemperatur an. Danach wurden 350µl Buffer RW 1 in die RNeasy MinElute Spin Columns pipettiert, für 15 Sekunden bei 13000 U/min zentrifugiert und anschließend die RNeasy MinElute Spin Columns in neue Collection Tubes überführt. Nach anschließender Zugabe von 500µl Buffer RPE und 15 Sekunden Zentrifugation bei 13000 U/min wurde der entstandene Durchfluss verworfen. Weiterhin wurden 500µl 80% Ethanol hinzupipettiert und bei 13000 U/min für 2 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde die RNeasy MinElute Spin Column wiederum in ein neues Collection Tube gegeben und bei geöffnetem Deckel sowie 13000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Erneut wurde die RNeasy MinElute Spin Column in ein neues Collection Tube überführt. Zur Lösung der RNA wurden 14µl RNase-freies Wasser auf die Membran pipettiert und die Tubes bei 13000 U/min für 1 Minute zentrifugiert. Die RNA befand sich nun im entstandenen Durchfluss. Anschließend konnte die RNA-Konzentration und deren Reinheit im Photometer (peqlab NanoDrop 1000) festgestellt werden.

2.4. Reverse Transkription

Ziel der reversen Transkription war die Herstellung von komplementärer DNA (cDNA) auf Basis der zuvor extrahierten RNA [84]. Dazu wurde das Bio-Rad iScript™ cDNA Synthese-Kit verwendet. Die Bezeichnung „5xiScript reaction mix“ wurde vom Hersteller des Kits für das mitgelieferte Reagenz verwendet. Für die Synthese der cDNA wurden 4µl des 5xiScript reaction mix, 1µl reverse Transkriptase, und insgesamt 15µl RNase-freies Wasser und RNA in ein Tube gegeben. Das Volumen der RNA wurde konzentrationsabhängig jeweils so gewählt, dass 1µg RNA pro Tube hinzupipettiert wurde. Der 5xiScript reaction mix enthielt bereits oligo(DT)- und

random hexamer-Primer, so dass eine gesonderte Zugabe von Primern für die reverse Transkription bei diesem Kit nicht nötig war. Als reverse Transkriptase enthielt das Kit RNase H⁺, eine MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus)-Variante. Für die Transkription wurde der Reaktionsansatz in die PCR-Maschine (peqlab® Primus25) gegeben und 5 Minuten bei 25°C, 30 Minuten bei 42°C und 5 Minuten bei 85°C inkubiert bevor er auf 4°C heruntergekühlt wurde. Danach konnte die synthetisierte cDNA bei -20°C langfristig gelagert werden.

2.5. Real-Time PCR

Die sogenannte Real-Time PCR wurde verwendet, um Unterschiede im Expressionsniveau bestimmter Zielgene in den präparierten Organen zu quantifizieren. Grundlage bei den Real-Time Experimenten dieser Arbeit ist die Erfassung des Fluoreszenzanstiegs eines mit der DNA interkalierenden Farbstoffs über einen vorher festgesetzten Schwellenwert (Threshold) hinaus. Der Amplifikationszyklus, bei dem dieser Fluoreszenzanstieg beobachtet wird, wird als Ct-Wert (Cycle Threshold-Wert) bezeichnet [85].

2.5.1. Verfahren

Bei den Experimenten dieser Arbeit wurden 64 Well-Platten verwendet. Pro pipettiertem Well wurden 6µl Sso Fast™ EvaGreen® (Bio-Rad), 0,5µl des Forward-Primers, 0,5µl des Reverse-Primers, 3µl aqua dest. sowie 2µl der 1:10 verdünnten cDNA verwendet. Für die Negativ-Kontrollen wurde anstelle von cDNA Wasser eingesetzt. Alle Wells wurden im doppelten Ansatz pipettiert. Als Standard wurden Verdünnungsreihen gepoolter cDNA der jeweiligen Organe angewandt. So wurden im Einzelnen Verdünnungen von 1:5, 1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000 jeweils organspezifischer cDNA-Pools verwendet. Die Verwendung eines Kalibrators in der Verdünnung 1:10 ermöglichte den Vergleich verschiedener Ansätze der Real-time PCR. Nach Pipettieren dieses Ansatzes wurden die Well-Platten max. 4 Sekunden zentrifugiert und in die Real-time PCR Maschine gegeben (Stratagene® Mx3000P). Zur initialen Denaturierung der cDNA wurden die Temperatur für 3 Minuten auf 95°C erhöht. Dann durchlief die Real-time PCR Maschine 40 Zyklen, in denen die Temperatur zunächst zur Denaturierung für 10 Sekunden auf 95°C gehalten wurde bevor sie für Annealing und Extension für 30 Sekunden auf 60°C gesenkt wurde. Diesen 40 Zyklen schlossen sich 80 Zyklen an, bei denen die cDNA für die spätere Schmelzkurvenanalyse abwechselnd für 1 Minute auf 95°C erhitzt und für 20 Sekunden auf 55°C gekühlt wurde.

2.5.2. Referenz- und Zielgene

Für die Real-time PCR wurden die in Tabelle 4 und 5 genannten Referenz- und Zielgene verwendet. Als Zielgene wurden sowohl nebennieren- als auch hodenspezifische Zielgene ausgewählt. Daneben wurden auch Zielgene untersucht, die in beiden Geweben exprimiert werden. Ziel der Untersuchung war die Quantifizierung der Expression nebennierenspezifischer Gene in Hodengewebe.

Primerpaar	18S
Forward-Primer	CGGCTACCACATCCAAGGAA
Reverse-Primer	GTCGGAATTACCGCGGCT
Länge des Produkts	190bp

Tabelle 4: Für die Real-time PCR verwendete Primer (Referenzgene)

Primerpaar	CYP11A1
Forward-Primer	GCTGGAAGGTGTAGCTCAGG
Reverse-Primer	CACTGGTGTGGAACATCTGG
Länge des Produkts	224bp

Primerpaar	CYP11B1
Forward-Primer	GCTCTGGAGAATTGCTGTCC
Reverse-Primer	CTGTAACCCAAGGGACATGC
Länge des Produkts	627bp

Primerpaar	CYP11B2
Forward-Primer	CAGGGCCAAGAAAACCTACA
Reverse-Primer	ACGAGCATTTTGAAGCACCT
Länge des Produkts	369bp

Tabelle 5: Für die Real-time PCR verwendete Primer (Zielgene)

Primerpaar	CYP17A1
Forward-Primer	TCAGCACCTTTCCCTGTTC
Reverse-Primer	CCAGGACATCCACAATACCC
Länge des Produkts	240bp

Primerpaar	CYP21A1
Forward-Primer	CAGGGAGTGGAGAAGCAAAG
Reverse-Primer	ACTCTTCCTGCAGTCGCTTC
Länge des Produkts	178bp (b/b); 374bp (aw18/aw18)

Primerpaar	MC2R
Forward-Primer	TGCCGAGAAAGATCCTACTTCAG
Reverse-Primer	TCCTTGGCTTTGTCTACTAATGC
Länge des Produkts	130bp (Var.1); 73bp (Var. 2)

Primerpaar	INSL3
Forward-Primer	TGCAGTGGCTAGAGCAGAGA
Reverse-Primer	TGCAATGACATAGCCAGGAG
Länge des Produkts	248bp

Primerpaar	AMH
Forward-Primer	GGGGGGTCTGAACAGCTATGAGT
Reverse-Primer	GAGGCTCTTGGAAGCTTCAGCAA
Länge des Produkts	233bp

Tabelle 5: Für die Real-time PCR verwendete Primer (Zielgene)

2.5.3. Auswertung der Real-time PCR

Zur Berechnung der Amplifikationseffizienz E der verschiedenen Primerpaare wurden die Ct-Werte der als Standard bezeichneten Verdünnungsreihen gepoolter cDNA gegen die jeweilige Konzentration gesetzt [98]. Aus den daraus resultierenden Graphen wurde die Steigung und

somit die Amplifikationseffizienz errechnet (Formel 1; nach [98]). Pro Zielgen und Genotyp wurde mit Gewebe von jeweils 8 Tieren im doppelten Ansatz gerechnet (n=8).

$$E = 10^{-1/\text{Steigung}}$$

Formel 1: Amplifikationseffizienz E

Die Ergebnisse der Real-time PCR wurden weiterhin mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode [98] ausgewertet. Grundlage war die Berechnung der relativen Expression r gegenüber einem durch die Experimente und Genotypen in seiner Expression nicht veränderten Referenzgen (Formel 2; nach [98]).

$$r = \frac{E_{\text{Zielgen}}^{\Delta\text{Ct Zielgen (Kalibrator - Probe)}}}{E_{\text{Referenzgen}}^{\Delta\text{Ct Referenzgen (Kalibrator - Probe)}}$$

Formel 2: Relative Expressionsrate r

Die relative Expressionsrate r wurde für jeweils für die Genotypen b/b sowie aw18/aw18 berechnet und als $r_{b/b}$ bzw. $r_{aw18/aw18}$ bezeichnet. Die Berechnung eines solchen Quotienten r wurde für jedes Zielgen mit dem Referenzgen 18S durchgeführt. Für jedes Zielgen wurde dann ein prozentualer Quotient R gebildet, der die relativen Expressionsniveaus der beiden Genotypen in ein Verhältnis brachte (Formel 3, nach [98]).

$$R_{\text{Zielgen}} = \frac{r_{aw18/aw18}}{r_{b/b}} \times 100\%$$

Formel 3: Relatives Expressionsverhältnis R

Das Signifikanzniveau von R wurde mit Hilfe des t-Tests errechnet. Alle Ergebnisse mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet und mit der Markierung „*“ versehen. Ergebnisse mit $p < 0,01$ wurden als statistisch hochsignifikant betrachtet und mit „**“ hervorgehoben. Für $p < 0,001$ wurde „***“ und für $p < 0,0001$ wurde „****“ verwendet. Zur Erstellung der Graphiken wurde GraphPad Prism Version 6.00 für Windows, (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com) verwendet.

HE-Färbung

Zur morphologischen Beurteilung wurden einzelne Paraffinschnitte der durch Präparation gewonnenen Organe mit der Hämatoxylin-Eosin-Methode (HE) gefärbt. Dazu wurden die Paraffinschnitte entparaffinisiert, rehydriert, gefärbt, wieder dehydriert und fixiert. Zur Entparaffinisierung erfolgte ein 2x3 minütiges Bad in Xylol, dann die Rehydrierung mit 2x3 Minuten 100% Ethanol, 2x3 Minuten 95% Ethanol sowie 2-3 Minuten Bad in ddH₂O (doppelt destilliertes Wasser). Zur Färbung wurden die Schnitte zunächst etwa 3 bis 5 Sekunden in Hämatoxylin gebadet, wenige Sekunden in ddH₂O sowie etwa 1 Minute in fließendem Leitungswasser gewaschen und anschließend ca. 10 Sekunden in Eosin getaucht. Daraufhin wurden die Schnitte wieder dehydriert. Zunächst 2x30 Sekunden in 95% Ethanol, dann 2x30 Sekunden in 100% Ethanol, 2x30 Sekunden in Xylol, abschließend wurden die Schnitte mit Permount und einem Deckglas fixiert.

2.6. Immunhistochemie

Zur histologischen Lokalisierung bestimmter Antigene wurden Gewebeschnitte der zuvor in Paraffin fixierten Organe der sogenannten Immunhistochemie (IHC) unterzogen. Die Immunhistochemie basiert auf der Bindung eines Primärantikörpers an ein spezifisches Antigen, der dann durch Bindung eines Sekundärantikörpers und Färbereaktion sichtbar gemacht wird [99]. Die einzelnen werden im Folgenden beschrieben. Zunächst wurden die Schnitte dazu hydriert. Dazu wurden sie 2x5 Minuten in Xylol, 2x10 Minuten in 100% Ethanol, 2x10 Minuten in 95% Ethanol sowie 1 Minute in destilliertes Wasser eingelegt. Zur Blockierung der endogenen Peroxidase der Gewebe erfolgte danach eine 10-minütige Behandlung mit 0,3% H₂O₂ in Methanol. Dem schlossen sich 2x5 Minuten Waschen in PBS an. Nach dem Waschen wurde jeder Gewebeschnitt mit einem hydrophoben Fettstift umrandet und jeder Schnitt mit 100µl Blocking Buffer (bestehend aus 95µl Blocking Solution und 5µl Goat Serum) für 15 Minuten behandelt. Danach wurde der Blocking Buffer per Filterpapier vorsichtig vom Gewebeschnitt gesaugt und der Gewebeschnitt daraufhin umgehend mit dem in Blocking Buffer verdünnten Primär-Antikörper (Primär-AK) für 12 Stunden bei 4°C in einer Feuchtigkeitskammer inkubiert. Die verwendeten Primär-AK sind in Tabelle 6 aufgelistet. Alle Primär- und Sekundär-Antikörper (Sekundär-AK, Tabelle 7) wurden in Blocking-Buffer verdünnt. Die Verdünnung des Primär-AK konnte in Abhängigkeit vom verwendeten Antikörper und gewünschter Färbungsintensität variieren. Ein Schnitt verblieb ohne Primär-AK als Negativkontrolle, ein Schnitt wurde immer mit dem Primär-AK anti-PCNA (Proliferating Cell

Nuclear Antigen) als Positivkontrolle inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgten 3x5 Minuten Waschen in PBS. Weiterhin wurden die Schnitte jeweils 30 Minuten mit dem Sekundär-Antikörper (Sekundär-AK) bei Raumtemperatur inkubiert. Für die in dieser Arbeit verwendeten, aus Kaninchen gewonnenen Primär-AK wurden "anti-rabbit"-Sekundärantikörper verwendet (Tabelle 7). Nach 3x5 Minuten Waschen in schloss sich eine 30minütige Inkubation mit ABC-Solution an (Vectastain® ABC-Kit). Dabei wurden pro Schnitt 100µl Blocking Solution, 1µl Reagenz A und 1µl Reagenz B verwendet. Danach wurden die Schnitte wiederum 3x5 Minuten in PBS gewaschen. Je nach gewünschter Färbungsintensität wurden die Schnitte dann 1–5 Minuten mit 3-3'-Diaminobenzidin (DAB)-Lösung (Sigma Fast DAB Tablets) inkubiert. Die Färbereaktion mit DAB wurde anschließend durch 2x5 Minuten Waschen in PBS gestoppt. Abschließend wurden die Schnitte durch 2x1 Minute Inkubation in 70% Ethanol, 2x1 Minute Inkubation in 95% Ethanol, 2x1 Minute Inkubation in 100% Ethanol sowie 2x5 Minuten Inkubation in Xylol dehydriert und mit Permount und einem Deckglas fixiert.

Name	INSL3 Antibody (M-122)
Hersteller	Santa Cruz Biotechnology
Katalognummer	sc-134587
Antigen-Spezifität	anti-Maus INSL3
AK-Typ	IgG, polyklonal
Spezies	Kaninchen
Hersteller-Konzentration	200 µg/ml
Verwendete Verdünnung	1:5000

Name	3β-HSD
Hersteller	Anita Payne, Stanford
Katalognummer	keine
Antigen-Spezifität	anti-Maus 3β-HSD
AK-Typ	polyklonal
Spezies	Kaninchen
Hersteller-Konzentration	unbekannt
Verwendete Verdünnung	1:4500

Name	PCNA Antibody (FL-261)
Hersteller	Santa Cruz Biotechnology

Katalognummer	sc-7907
Antigen-Spezifität	anti-Maus PCNA
AK-Typ	IgG, polyklonal
Spezies	Kaninchen
Hersteller-Konzentration	200 µg/ml
Verwendete Verdünnung	1:500

Tabelle 6: Verwendete Primär-Antikörper

Sekundär-AK	Anti-Kaninchen
AK-Typ	IgG, biotyniliert
Spezies	Ziege
Verdünnung	1:200

Tabelle 7: Verwendeter Sekundär-Antikörper

3. Ergebnisse

3.1. Genotypisierung

Bei der Genotypisierung der fetalen Mäuse ergab sich die in Tabelle 8 dargestellte Häufigkeitsverteilung. Zusammen mit den nicht zu den Versuchen herangezogenen weiblichen Feten trugen insgesamt 42 der Feten den Genotyp aw18/aw18, 78 aw18/b und 68 b/b. Für die männlichen Feten ergab sich damit eine relative Verteilung der Genotypen von 1,00: 1,68: 1,32 (aw18/aw18: aw18/b: b/b), für die weiblichen Feten eine relative Verteilung von 1,00: 2,12: 1,47 (aw18/aw18: aw18/b: b/b), insgesamt eine relative Verteilung von 1,00: 1,86: 1,62 (aw18/aw18: aw18/b: b/b). Als Beispiel für die Ergebnisse der Genotypisierung ist eine Elektrophorese in Abbildung 4 dargestellt.



Abb. 4: Genotypisierung von Feten des Gestationsalters E18.5 (Beispiel)

	männlich	weiblich
aw18/aw18	25 (25%)	17 (19%)
aw18/b	42 (42%)	36 (41%)
b/b	33 (33%)	35 (40%)
Gesamt	100 (100%)	88 (100%)

Tabelle 8: Häufigkeitsverteilung der Genotypen

3.2. HE-Färbung

Zur Erfassung histologischer Veränderungen wurde jeweils eines der zuvor präparierten, paarigen Organe mit der HE-Methode gefärbt. Die histologischen Bilder der Nebennieren zeigten bei b/b- und aw18/aw18-Feten keine mikroskopisch erkennbaren Unterschiede (Abb. 5, oben). Sie zeigten beide den für fetale Nebennieren typischen Aufbau in adulten und fetalen Cortex sowie Medulla. Es zeigte sich ausschließlich adrenales Gewebe. Genauso waren in den HE-Schnitten der fetalen Hoden keine mikroskopischen Unterschiede zwischen b/b- und

aw18/aw18 erfassbar (Abb. 5, unten). Die Schnitte der fetalen Hoden waren frei von Resten anderer Gewebe und zeigten den typischen Aufbau in tubuli seminiferi und Interstitium.

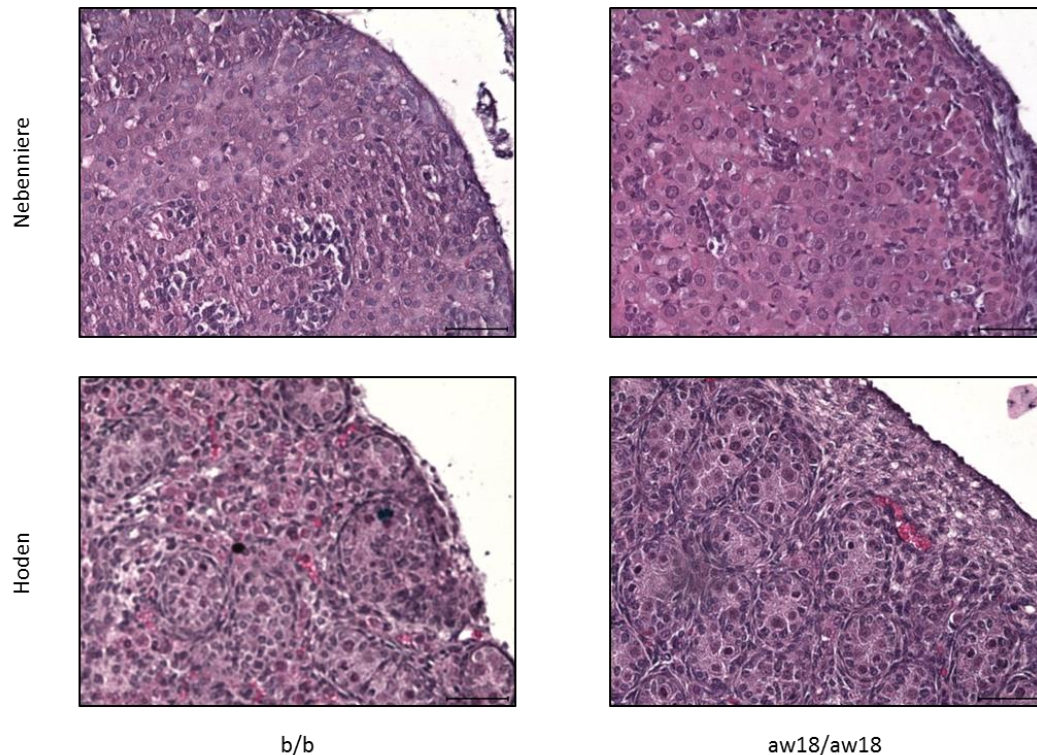


Abb. 5: HE-Färbung von fetalen Nebennieren und Hoden (E18.5). Der Skalierungsbalken entspricht 200µm Die HE-Färbung zeigt keine qualitativen Unterschiede zwischen den Genotypen, weder für fetale Hoden, noch für fetale Nebennieren

3.3. Immunhistochemie

Die durchgeführten immunhistochemischen Färbungen werden beispielhaft in Abbildung 6 dargestellt. Nach Screening der HE-Färbungen wurden pro Organ und Genotyp 2 Färbungen von jeweils 2 unterschiedlichen Mäusen durchgeführt.

Ziel der Immunhistochemie mit 3β-HSD (3β-Hydroxysteroiddehydrogenase, HSD3B1)-Antikörpern war der Nachweis und die Lokalisation von Zellen in den fetalen Nebennieren und Hoden, die der Steroidbiosynthese mächtig sind. Abbildung 6 zeigt in der oberen Bildreihe immunhistochemische Färbungen fetaler Nebennieren mit 3β-HSD, wobei 3β-HSD-positive Zellen deutlich braun gefärbt sind. Der adrenale Cortex zeigte sich dabei sowohl in den Schnitten von b/b-als auch von aw18/aw18-Mäusen reich an 3β-HSD-positiven Zellen, während die Medulla ausgespart blieb. Unterschiede in Quantität oder Lokalisation von 3β-HSD zwischen b/b- und aw18/aw18-Nebennieren waren nicht feststellbar.

Die Immunhistochemie von fetalen Hoden mit 3 β -HSD Antikörpern (Abb. 6, zweite Reihe von oben) zeigte eine Konzentration von 3 β -HSD im testikulären Interstitium. Dort zeigten sich reichlich, in Abb. 6 braun gefärbte, 3 β -HSD-positive Zellen. Quantitative oder qualitative Unterschiede im Färbungsmuster zwischen Schnitten von b/b- und aw18/aw18-Mäusen waren nicht feststellbar.

Die Immunhistochemie von fetalen Nebennieren und Hoden mit INSL3-Antikörpern (Abb. 6, dritte und vierte Reihe von oben) diente dem Nachweis Leydig-Zell-spezifischer Proteine. INSL3-positive Zellen sind in Abb. 6 braun dargestellt. Die Schnitte von Nebennieren von b/b-Mäusen zeigten keine Färbung mit INSL3-Antikörpern. Dagegen zeigten Schnitte von Nebennieren von aw18/aw18-Mäusen eine unregelmäßige Färbung einiger Zellen mit INSL3-Antikörpern. Die Immunhistochemie von fetalen Hoden mit INSL3-Antikörpern zeigte eine schwache, auf das testikuläre Interstitium begrenzte Färbung (Abb. 6, 4. Reihe von oben). Quantitative oder qualitative Unterschiede zwischen Hoden von b/b- und aw18/aw18-Mäusen waren nicht erfassbar.

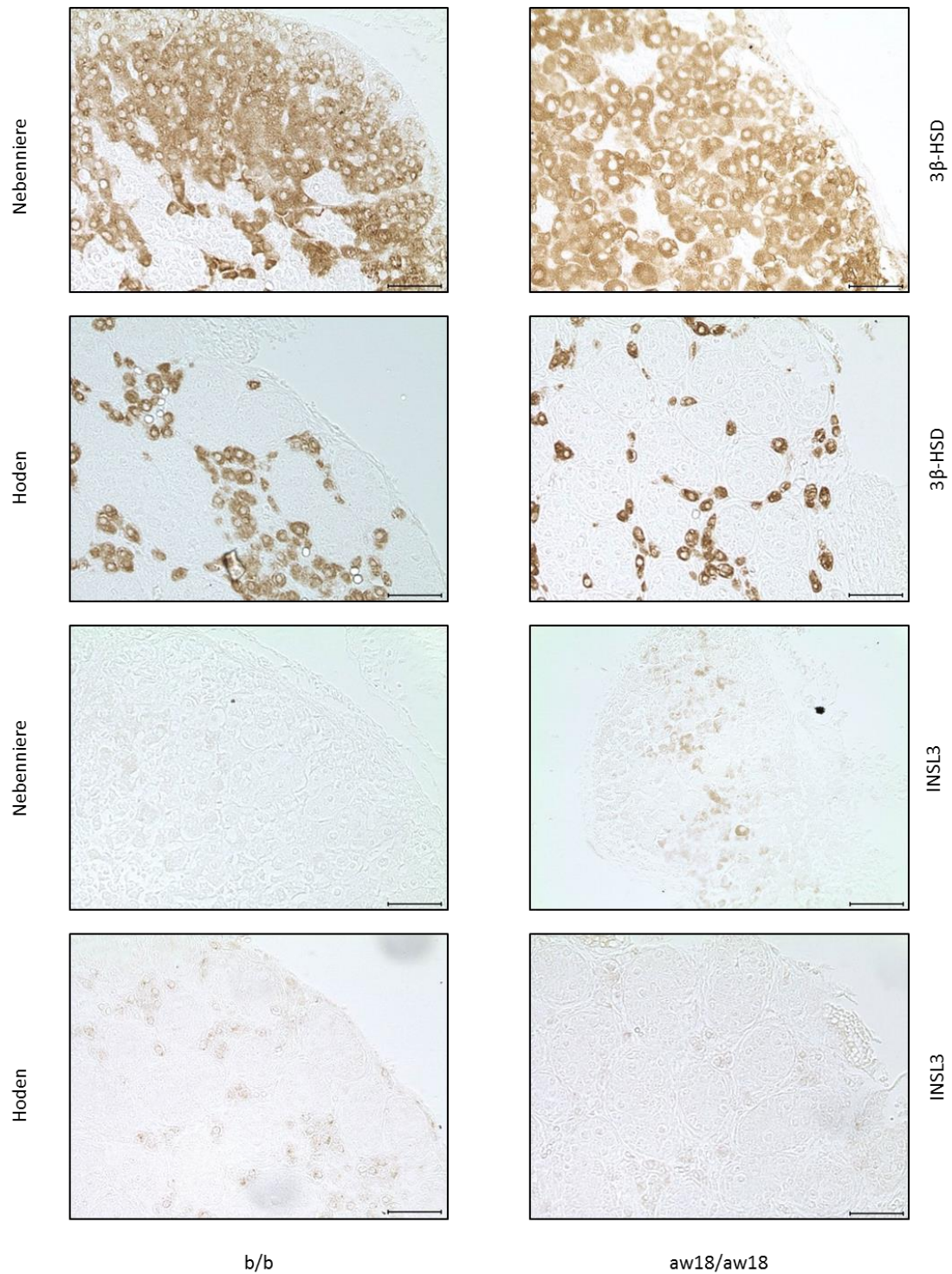


Abb. 6: Überblick über die IHC von fetalen Nebennieren und Hoden (E18.5). Der Skalierungsbalken entspricht 200 μ m. Während sich für 3 β -HSD jeweils bei Hoden und Nebenniere kein qualitativer Unterschied zwischen den Genotypen zeigt, ist INSL3 bei aw18/aw18 –Nebennieren erkennbar häufiger exprimiert als bei b/b-Nebennieren. Für fetalen Hoden war dieser Unterschied nicht erkennbar.

3.4. Real-time PCR

Um die Effekte der Genotypen b/b und aw18/aw18 auf die Expression von Genen der Steroidbiosynthese sowie die Expression hodenspezifischer Gene relativ zu quantifizieren, wurde die Real-time PCR durchgeführt. Diese wurde auf der Basis des Referenzgens 18S für Hoden und Nebenniere durchgeführt.

Wie in Abbildung 7 und in Tabelle 9 dargestellt, zeigte sich dabei für fetale Nebennieren (E18.5) folgendes Bild: CYP21A1 war bei aw18/aw18-Organen in Relation zu b/b-Organen signifikant erniedrigt. MC2R, CYP11A1, CYP11B1 und CYP11B2 waren bei aw18/aw18 in Relation zu b/b signifikant erhöht. Für CYP17A1 zeigte sich ein nicht signifikanter Trend zur Erhöhung bei aw18/aw18-Nebennieren im Vergleich zu b/b-Nebennieren, wobei die Ct-Werte <30 waren. Für AMH konnte zwischen den Genotypen kein Unterschied in der adrenalen Expression gemessen werden. INSL3 war in aw18/aw18-Nebennieren im Vergleich zu b/b-Nebennieren signifikant erhöht.

Abbildung 8 zeigt das Expressionsniveau der untersuchten Zielgene in fetalen Hoden (E18.5), die jeweiligen numerischen Ergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefasst. Die Expression von CYP21A1 war bei aw18/aw18-Hoden im Vergleich zu b/b-Hoden signifikant erniedrigt. Keine Unterschiede zwischen den Genotypen zeigten sich dagegen für MC2R, CYP11A1, CYP11B1 und CYP11B2. Ebenso waren für CYP17A1, AMH und INSL3 keine Unterschiede im Expressionsniveau zwischen den Genotypen messbar.

Gen	CYP21A1	MC2R	CYP11A1	CYP11B1
Mittelwert \pm SEM von b/b	1,251 \pm 0,1205, n=8	1,142 \pm 0,1196, n=8	0,6368 \pm 0,05548, n=8	2,400 \pm 0,4639, n=8
Mittelwert \pm SEM von aw18/aw18	0,1663 \pm 0,01829, n=8	1,900 \pm 0,2730, n=8	1,495 \pm 0,1916, n=8	4,517 \pm 0,8549, n=8
p-Wert	< 0,0001	0,0234	0,0007	0,0471
Gen	CYP11B2	CYP17A1	AMH	INSL3
Mittelwert \pm SEM von b/b	0,2269 \pm 0,03019, n=8	7,492 \pm 1,418, n=8	1,707 \pm 0,1760, n=8	1,699 \pm 0,1553, n=8
Mittelwert \pm SEM von aw18/aw18	0,8120 \pm 0,1232, n=8	13,82 \pm 3,564, n=8	2,033 \pm 0,2912, n=8	2,717 \pm 0,4028, n=8
p-Wert	0,0004	0,1211	0,3551	0,0335

Tabelle 9: Übersicht der Ergebnisse der real-time PCR für fetale Nebennieren (E18.5) Die Abkürzung SEM bezeichnet den „Standard error of the mean“.

Gen	CYP21A1	MC2R	CYP11A1	CYP11B1
Mittelwert \pm SEM von b/b	0,6855 \pm 0,09032, n=8	45,72 \pm 7,408, n=8	10,99 \pm 1,264, n=8	3,397 \pm 0,9406, n=8
Mittelwert \pm SEM von aw18/aw18	0,05502 \pm 0,004780, n=8	54,86 \pm 7,941, n=8	10,22 \pm 0,4726, n=8	3,083 \pm 0,5044, n=8
p-Wert	< 0,0001	0,4142	0,5762	0,7729
Gen	CYP11B2	CYP17A1	AMH	INSL3
Mittelwert \pm SEM von b/b	6,691 \pm 1,621, n=8	7,370 \pm 1,124, n=8	0,06291 \pm 0,005581, n=8	1,962 \pm 0,2765, n=8
Mittelwert \pm SEM von aw18/aw18	6,771 \pm 2,336, n=8	8,661 \pm 1,050, n=8	0,06059 \pm 0,007863, n=8	1,833 \pm 0,1967, n=8
p-Wert	0,9779	0,4152	0,8140	0,7093

Tabelle 10: Übersicht der Ergebnisse für fetale Hoden (E18.5) Die Abkürzung SEM bezeichnet den „Standard error of the mean“.

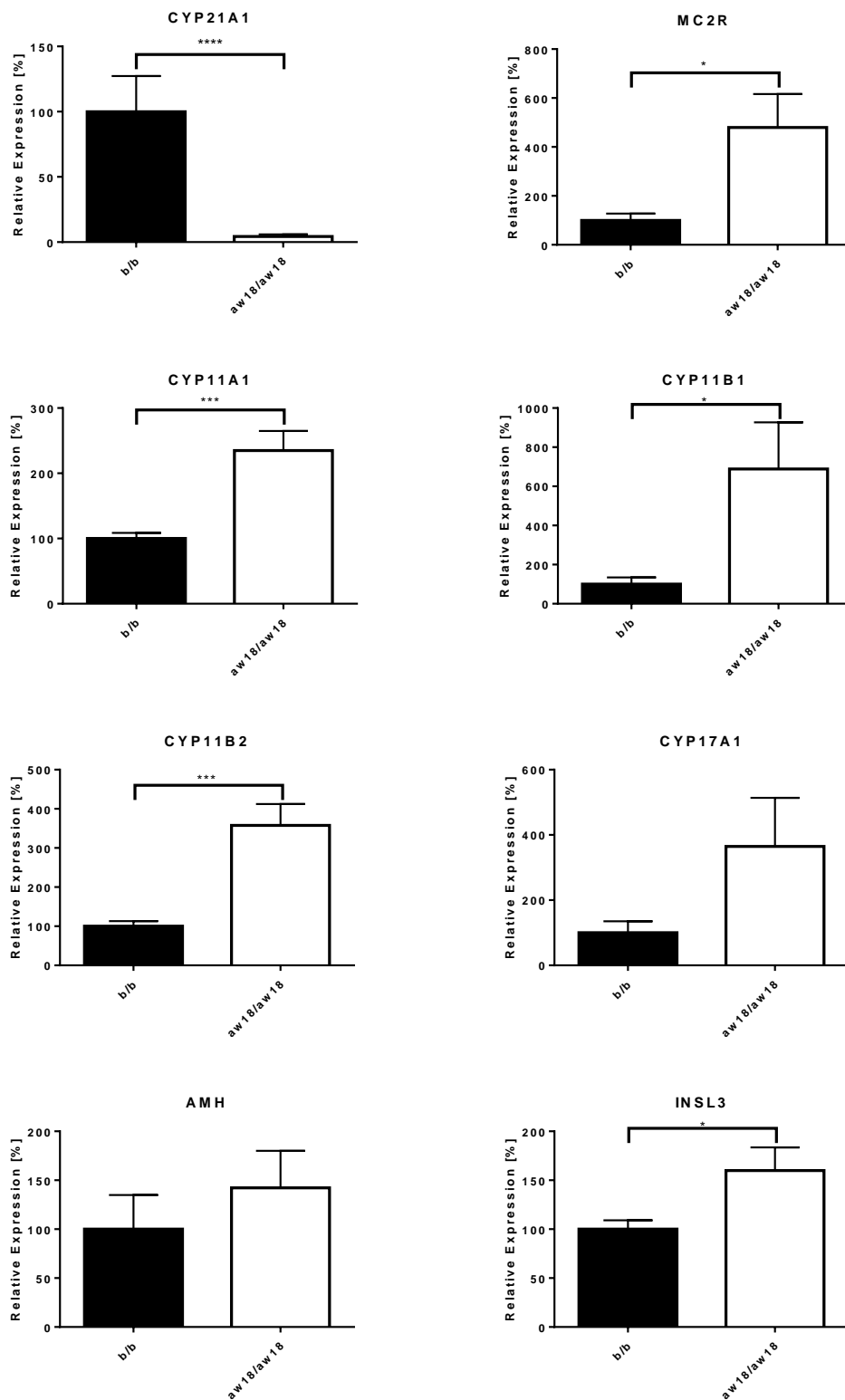


Abb. 7: Relative Quantifizierung der Expression von Enzymen der Steroidbiosynthese und hodenspezifischer Gene in fetalen Nebennieren (E18.5) auf Basis des Referenzgens 18S (n=8); Die Fehlerbalken stellen den SEM (Standard error of the mean) dar und b/b wurde als 100% definiert

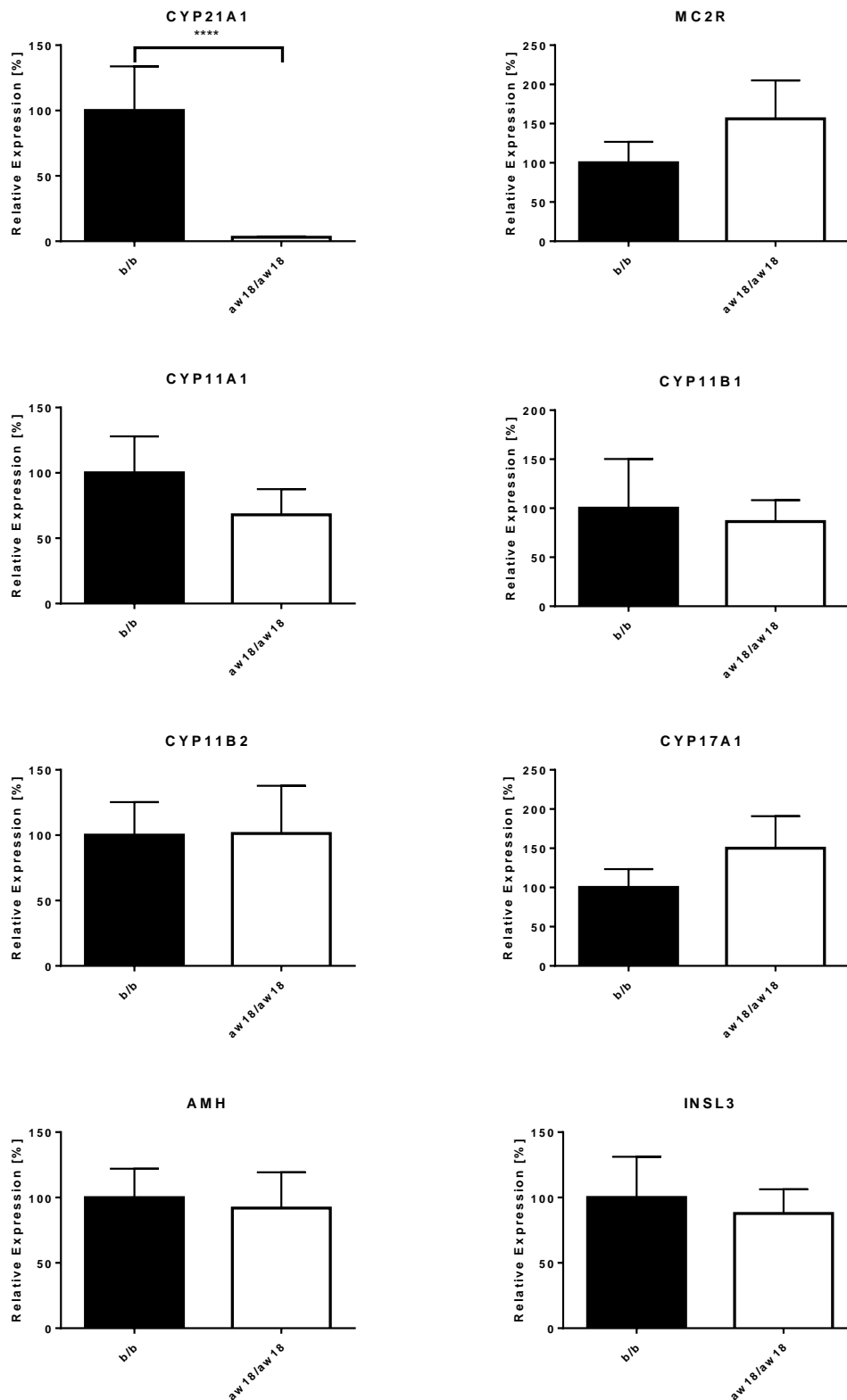


Abb. 8: Relative Quantifizierung der Expression von Enzymen der Steroidbiosynthese und hodenspezifischer Gene in fetalen Hoden (E18.5) auf Basis des Referenzgens 18S (n=8); Die Fehlerbalken stellen den SEM (Standard error of the mean) dar und b/b wurde als 100% definiert.

4. Diskussion

4.1. Adrenale Resttumore bei Mäusefeten

Gängige Vorstellung zur Entwicklung und Pathophysiologie von TART ist, dass während der embryonalen Entwicklung adrenale Zellen beim Descensus testis mit dem Hoden verschleppt werden und dort durch Exposition durch systemisch erhöhten ACTH-Spiegeln zu adrenalen Resttumoren heranwachsen [100]. Eine entscheidende pränatale oder frühkindliche Beeinflussung des TART-Wachstums wird vermutet.

Val *et al.* beschrieben in fetalen Maushoden des Gestationsalters E14.5 sogenannte „adrenal-like cells“, die sich an der Schnittstelle von Nebenniere und Hoden befinden, und als möglicher Ursprung von TART betrachtet werden [77]. Grundlage der Einstufung dieser „adrenal-like cells“ als nebennierenähnlich mit teils testikulären Attributen war die Expression der adrenalen Markerenzyme CYP11B1 und CYP21A1, aber auch des für testikuläre Zellen typischen CYP17A1 bei fehlender Expression des Leydig-Zell Markers INSL3 [77]. Val *et al.* beschrieben ebenfalls eine in vitro-Stimulierbarkeit der „adrenal-like cells“ mit ACTH und HCG [77]. Hier zeigte sich zum Entwicklungszeitpunkt E14.5 eine Induzierbarkeit der Expression von CYP11B1 [77]. Haupterkennnis der vorliegenden Arbeit ist nun der fehlende Unterschied in der testikulären Expression adrenaler Markerenzyme zwischen gesunden b/b-Mäusen und 21-Hydroxylase defizienten aw18/aw18-Mäusen zum Entwicklungszeitpunkt E18.5. Daneben zeigte sich eine so noch nicht beschriebene adrenale Expression von INSL3 bei 21OHD-Mäusen, was als weiterer Hinweis auf die gemeinsame Entwicklung von Hoden und Nebenniere gedeutet werden kann.

Die Erfassung quantitativer Veränderungen weniger Zellen bei fetalen, murinen Organen erfordert ein hohes Maß an methodischer Genauigkeit. Daher wurden die präparierten Organe sowohl mikroskopisch mit der HE-Färbung als auch per Real-time PCR auf ihre Reinheit geprüft. Die HE-Färbungen zeigten keine fälschliche Präparation anderer Organe oder Reste anderer Organe (Abb. 5). Ebenso zeigte die Real-time PCR die korrekte Zuordnung der Organe zu den jeweiligen Genotypen, wie in Abb. 7 und 8 anhand der dem Genotyp entsprechenden Expression von CYP21A1 ersichtlich wird.

4.2. Adrenale und testikuläre Expression adrenaler Markergene

Die Expression der Gene, die klassischerweise der adrenalen Steroidbiosynthese zugeordnet werden, zeigt sich in den fetalen Nebennieren von aw18/aw18-Mäusen im Vergleich zu b/b-Mäusen erhöht. Entsprechend des Genotyps und der bereits in Voruntersuchungen festgestellten erniedrigten systemischen Corticosteron-Spiegel [68], sind CYP21A1 erniedrigt und CYP11A1, CYP11B1 sowie CYP11B2 signifikant erhöht (Abb. 7). Dies ist vereinbar mit der Erwartung, dass systemisch erhöhte ACTH-Spiegel über den MC2R-Rezeptor zu einer Erhöhung der Expression adrenaler Gene und einer Hyperplasie der Nebenniere führen. Es stellt sich nun die Frage, ob und wie sich vor dem Hintergrund dieser Veränderungen und der bereits beschriebenen „adrenal-like cells“ das Expressionsniveau adrenaler Markergene im Hoden ändert. Dort zeigte sich nur die dem Genotyp aw18/aw18 entsprechende Erniedrigung von CYP21A1, während hingegen CYP11A1, CYP11B1 und CYP11B2 im Vergleich von b/b- und aw18/aw18-Organen unverändert blieben (Abb. 8). CYP17A1, AMH und INSL3 zeigten ebenfalls keine Veränderung (Abb. 8). Damit scheinen sich testikuläre Zellen, die adrenale Markergene exprimieren, zum Gestationsalter E18.5 anders zu verhalten als Nebennierenzellen. Eine unterschiedliche Regulierung des Wachstums kann vermutet werden. Einen klaren Zusammenhang zwischen der Stimulation durch systemisch erhöhte ACTH-Spiegel bei 21OHD-Mäusen und dem Wachstumsverhalten von testikulären Zellen mit adrenalen Attributen herzustellen ist zum Zeitpunkt E18.5 nicht möglich. Das Maß der Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf die Situation beim Menschen lässt sich nur vermuten. Allerdings zeigt sich an einer Studie von Reisch *et al.* [14]: Hier korrelierte das adrenale Volumen bei Patienten mit 21OHD positiv mit den laborchemischen Werten von Androstendion, morgendlichem 17-OHP und 24h-Urin Pregnantriol, nicht aber das Volumen der TART bei den Patienten [14]. Zusätzlich scheint das testikuläre Expressionsniveau von MC2R und CYP11B2 bei Mäusen der vorliegenden Arbeit höher zu sein als deren adrenales Expressionsniveau, was die Übertragbarkeit auf den Mensch einschränkt.

4.3. Testikuläre Expression adrenaler Markergene im Verlauf der fetalen und postpartalen Entwicklung

Der fehlende stimulatorische Einfluss von 21OHD auf die Expression adrenaler Markergene im Hoden gibt vor dem Hintergrund der bereits in anderen Arbeiten beschriebenen Expression von MC2R in fetalen murinen Hoden und der ebenfalls bereits beschriebenen Stimulierbarkeit

der testikulären Expression adrenaler Markerenzyme durch ACTH oder HCG Anlass zur Diskussion [77]. Das Fehlen eines Effektes von 21OHD auf die testikuläre Expression adrenaler Markergene zum Zeitpunkt E18.5 bei Mäusen erklären könnte das Entwicklungsstadium und die lokale Nische. Darüber hinaus müssen bei der Erklärung der Pathogenese von gonadalen adrenalen Resttumoren speziesspezifische Unterschiede zum Menschen diskutiert werden.

Abb. 9 legt eine Abhängigkeit der Stimulierbarkeit testikulärer adrenaler Restzellen vom Entwicklungsstadium nahe. Während Val *et al.* in vitro in fetalen murinen Hoden (E14.5) durch Stimulation mit ACTH oder HCG die Expression des nebennierenspezifischen Markergens CYP11B1 induzieren konnten [77], zeigte sich bei dieser Arbeit (E18.5) 4 Entwicklungsstage später in vivo bei den Hoden von aw18/aw18-Mäusen kein Effekt im Vergleich zu b/b-Mäusen (Abb. 9; nach [76, 77, 79]). Ebenso ließen sich die Ergebnisse von Val *et al.* bei Hu *et al.* nicht mit Hoden neonataler Mäuse wiederholen [76]. In vitro-Stimulationsversuche mit ACTH oder HCG zeigten weder einen Effekt auf die Expression von CYP11B1 noch von CYP21A1 [76]. Demgegenüber steht eine Arbeit, die bei neonatalen CYP11A1-Null Mäusen eine ektope testikuläre Expression von CYP21A1 zeigen konnte, wobei durch die komplette Ausschaltung der Steroidsynthese die Vergleichbarkeit mit anderen Experimenten eingeschränkt ist [79].

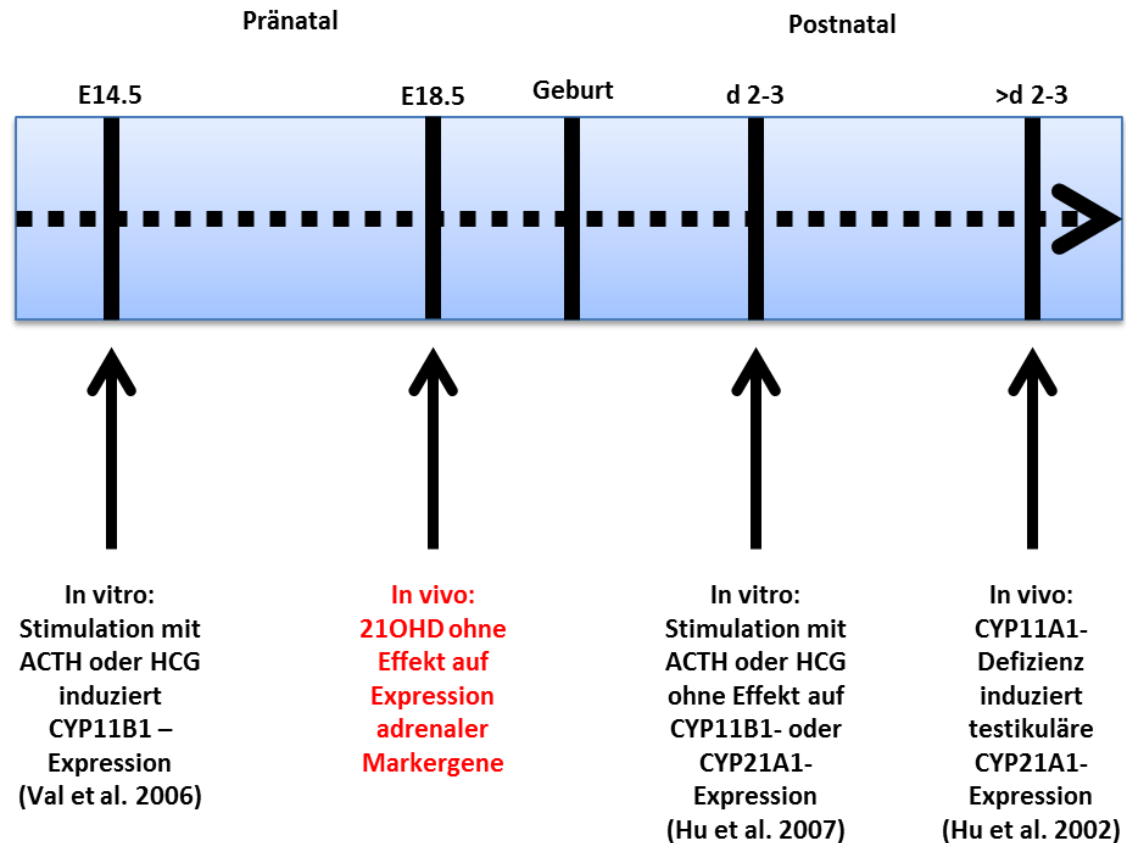


Abb. 9: Gestations- bzw. Lebensalter-abhängige Darstellung der Ergebnisse dieser Arbeit (rot) und vorangegangener in vitro und in vivo Experimente bei Mäusen, bei denen der Effekt von ACTH oder HCG auf die Expression von CYP11B1 oder CYP21A1 im Hoden untersucht wurde

Weiterhin beleuchtet werden muss die Abhängigkeit der Entwicklung von TART von der lokalen Nische. Während bei dieser Arbeit in Nebennieren von aw18/aw18-Mäusen ein eindeutiger, signifikanter Trend zu einer erhöhten Expression von Genen der Steroidsynthese zu beobachten war, war dies bei Hoden von aw18/aw18-Mäusen nicht der Fall. Darüber hinaus muss angesichts der bereits *in vitro* nachgewiesenen Stimulierbarkeit adrenaler Markerenzyme im Hoden durch ACTH [77] der Einfluss lokaler, *in vivo* wirksamer testikulärer Faktoren diskutiert werden.

Weiterhin muss bei der Aufklärung der Pathogenese gonadaler adrenaler Resttumore die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen diskutiert werden. Die in dieser Arbeit verwendeten 21OHD-Mäuse sterben ohne Glukokortikoids substitution spätestens an Tag 15 post partum, weswegen sich Arbeiten mit diesen Mäusen auf fetale, bzw. frühe neonatale Entwicklungsstadien beziehen [64, 65]. Grundsätzlich ist eine Entwicklung von gonadalen adrenalen Resttumoren erst zu späteren Lebensaltern aber möglich. Im Vergleich nimmt beim

Menschen die Prävalenz von TART nach der Pubertät steil zu, wobei auch für Kinder eine Prävalenz von 24% beschrieben ist [58]. Es bleibt damit offen, ob das Zeitfenster zwischen E14.5 und wenigen Tagen post partum geeignet ist, um die Entwicklung von TART im Mausmodell zu untersuchen.

4.4. Adrenale Expression von INSL3

INSL3 ist ein bei der Maus von Leydig- und Luteal-Zellen sezerniertes Peptid, das als spezifisch für diese beiden Zelltypen betrachtet wird [92]. Mäuse mit Defekt im Gen für INSL3 oder dessen Rezeptor RXFP2 zeigen einen primären Kryptorchismus [93, 94]. In den bisher veröffentlichten Arbeiten zu INSL3 wird dessen Expression als weitgehend konstitutiv und unreguliert beschrieben [92]. Bis auf eine Ausnahme [102] existiert kein Hinweis für die adrenale Expression von INSL3.

Bei den Experimenten dieser Arbeit zeigte sich dagegen in den fetalen Nebennieren von aw18/aw18-Mäusen eine signifikante Steigerung der INSL3-Expression im Vergleich zu b/b-Mäusen (Abb. 7). Dieser Befund bestätigte sich in der IHC der Nebennieren, wo INSL3 bei Nebennieren von aw18/aw18-Mäusen detektierbar war, nicht aber bei Nebennieren von b/b-Mäusen (Abb. 6). Dieser Befund legt den Schluss nahe, dass INSL3 in Nebennieren durchaus exprimiert werden kann. Weiterhin kann die adrenale Expression des als Leydig-Zell spezifisch geltenden INSL3 als weiterer Hinweis auf eine gemeinsame Vorläufer-Zelle von Nebennieren- und Leydig-Zellen interpretiert werden. Die adrenale Expression von INSL3 könnte Ausdruck der Vermehrung einer Zellpopulation sein, die sich auf der einen Seite von typischen Nebennierenzellen unterscheidet, auf der anderen Seite aber auch nicht identisch mit Leydig-Zellen zu sein scheint. Das Vorhandensein von Leydig-Zellen in Nebennieren zum Zeitpunkt E18.5 würde auch die Erhöhung der adrenalen Expression von CYP17A1 bei aw18/aw18-Mäusen erwarten lassen, was bei den Experimenten dieser Arbeit aber nicht zu beobachten war (Abb. 7). Genauso scheinen die Zellen, die in der Nebenniere INSL3 exprimieren, nicht mit den „adrenal-like cells“ identisch zu sein, da die „adrenal-like cells“ kein INSL3 exprimieren [77].

Die Erhöhung der adrenalen Expression von INSL3 bei aw18/aw18-Mäusen lässt auch den Schluss zu, dass die Expression von INSL3 durch lokale oder systemische Faktoren beeinflussbar ist. Bei den aw18/aw18-Mäusen in Frage kommen die systemisch erhöhten ACTH-Spiegel, die lokal und systemisch erniedrigten Corticosteron-Spiegel, der lokale und systemische Mangel an Aldosteron sowie systemisch erhöhte Renin-Spiegel.

Die einzige andere Arbeit, die eine adrenale Expression von INSL3 erwähnt, ist ein Fallbericht eines Patienten mit adrenalen Cushing Syndrom auf der Basis einer beidseitigen makronodulären Hyperplasie [102]. Dort wurden nach bilateraler Adrenektomie in den entnommenen Nebennieren ACTH-produzierende Zellen nachgewiesen, die auch CYP17A1 und INSL3 exprimierten [46]. Sollte der Anstieg von INSL3 in Nebennieren von aw18/aw18-Mäusen mit diesen Zellen in Verbindung stehen, wäre ebenfalls ein Anstieg von CYP17A1 zu erwarten gewesen. Bei dieser Arbeit zeigte sich kein signifikanter Anstieg von CYP17A1 bei aw18/aw18-Mäusen im Vergleich zu b/b-Mäusen (Abb. 7). Die adrenale Expression von ACTH wurde in dieser Arbeit nicht untersucht.

5. Fazit und Zusammenfassung

Fragestellung dieser Arbeit war die Untersuchung quantitativer Veränderungen der Expression adrenaler Markergene in fetalen, murinen Hoden. Nun kommt es bei 21-Hydroxylase defizienten fetalen Mäusen des Gestationsalters E18.5 zu einer Erhöhung der Expression adrenaler Markerenzyme in der Nebenniere, während quantitative Veränderungen der Expression adrenaler Markerenzyme im Hoden nicht vorhanden sind. Aus diesem Ergebnis lässt sich der indirekte Hinweis ableiten, dass bei Mäusen mit 21OHD das Wachstum von testikulären Zellen mit adrenalen Attributen anders reguliert wird als das Wachstum von Nebennierenzellen. Insbesondere das lokale testikuläre Milieu und eine vom Entwicklungsalter abhängige Regulation des Wachstums können als Grund für diesen Unterschied zwischen Hoden und Nebenniere vermutet werden. Daneben existiert möglicherweise in der fetalen Nebenniere bei Mäusen eine Zellpopulation, die INSL3 exprimiert. Diese Zellpopulation könnte auf die Existenz einer gemeinsamen Progenitor-Zelle von Nebennieren- und Leydig-Zellen hindeuten. Zur genaueren Klärung der Entwicklung und Pathophysiologie von TART sind weitere Experimente nötig, die sich insbesondere mit der lokalen testikulären Regulation des TART-Wachstums auseinandersetzen. Dazu liefert die Existenz von INSL3 in der Nebenniere einen Hinweis zur Pathophysiologie der beidseitigen makronodulären Hyperplasie, was in weiteren Arbeiten erörtert werden muss.

6. Literaturverzeichnis

1. Merke, D.P. and S.R. Bornstein, *Congenital adrenal hyperplasia*. Lancet, 2005. **365**(9477): p. 2125-36.
2. Speiser, P.W. and P.C. White, *Congenital adrenal hyperplasia*. N Engl J Med, 2003. **349**(8): p. 776-88.
3. van der Kamp, H.J. and J.M. Wit, *Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia*. Eur J Endocrinol, 2004. **151 Suppl 3**: p. U71-5.
4. Arlt, W. and N. Krone, *Adult consequences of congenital adrenal hyperplasia*. Horm Res, 2007. **68 Suppl 5**: p. 158-64.
5. Speiser, P.W., et al., *High frequency of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency*. Am J Hum Genet, 1985. **37**(4): p. 650-67.
6. Balsamo, A., et al., *Impact of molecular genetics on congenital adrenal hyperplasia management*. Sex Dev, 2010. **4**(4-5): p. 233-48.
7. Nimkarn, S. and M.I. New, *Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: A paradigm for prenatal diagnosis and treatment*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1192**: p. 5-11.
8. Yang, Z., et al., *Modular variations of the human major histocompatibility complex class III genes for serine/threonine kinase RP, complement component C4, steroid 21-hydroxylase CYP21, and tenascin TNX (the RCCX module). A mechanism for gene deletions and disease associations*. J Biol Chem, 1999. **274**(17): p. 12147-56.
9. White, P.C., M.I. New, and B. Dupont, *Structure of human steroid 21-hydroxylase genes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(14): p. 5111-5.
10. Tajima, T., K. Fujieda, and Y. Fujii-Kuriyama, *de novo mutation causes steroid 21-hydroxylase deficiency in one family of HLA-identical affected and unaffected siblings*. J Clin Endocrinol Metab, 1993. **77**(1): p. 86-9.
11. White, P.C. and P.W. Speiser, *Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency*. Endocr Rev, 2000. **21**(3): p. 245-91.
12. Speiser, P.W., et al., *Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency*. J Clin Invest, 1992. **90**(2): p. 584-95.
13. Krone, N., et al., *Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(3): p. 1059-65.
14. Reisch, N., et al., *Total adrenal volume but not testicular adrenal rest tumor volume is associated with hormonal control in patients with 21-hydroxylase deficiency*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(5): p. 2065-72.
15. Nermoen, I., et al., *High frequency of adrenal myelolipomas and testicular adrenal rest tumours in adult Norwegian patients with classical congenital adrenal hyperplasia because of 21-hydroxylase deficiency*. Clin Endocrinol (Oxf), 2011. **75**(6): p. 753-9.
16. Merke, D.P., et al., *Adrenomedullary dysplasia and hypofunction in patients with classic 21-hydroxylase deficiency*. N Engl J Med, 2000. **343**(19): p. 1362-8.
17. Reisch, N., W. Arlt, and N. Krone, *Health problems in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency*. Horm Res Paediatr, 2011. **76**(2): p. 73-85.
18. Speiser, P.W., et al., *Congenital adrenal hyperplasia due to steroid 21-hydroxylase deficiency: an Endocrine Society clinical practice guideline*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(9): p. 4133-60.
19. Nimkarn, S. and M.I. New, *Prenatal diagnosis and treatment of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency*. Mol Cell Endocrinol, 2009. **300**(1-2): p. 192-6.

20. Khalid, J.M., et al., *Incidence and clinical features of congenital adrenal hyperplasia in Great Britain*. Arch Dis Child, 2012. **97**(2): p. 101-6.
21. Speiser, P.W., *Nonclassic adrenal hyperplasia*. Rev Endocr Metab Disord, 2009. **10**(1): p. 77-82.
22. Moran, C., et al., *21-Hydroxylase-deficient nonclassic adrenal hyperplasia is a progressive disorder: a multicenter study*. Am J Obstet Gynecol, 2000. **183**(6): p. 1468-74.
23. Muthusamy, K., et al., *Clinical review: Adult height in patients with congenital adrenal hyperplasia: a systematic review and metaanalysis*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(9): p. 4161-72.
24. Therrell, B.L., *Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia*. Endocrinol Metab Clin North Am, 2001. **30**(1): p. 15-30.
25. White, P.C., *Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia*. Nat Rev Endocrinol, 2009. **5**(9): p. 490-8.
26. Riepe, F.G. and W.G. Sippell, *Recent advances in diagnosis, treatment, and outcome of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency*. Rev Endocr Metab Disord, 2007. **8**(4): p. 349-63.
27. Riepe, F.G., et al., *Management of congenital adrenal hyperplasia: results of the ESPE questionnaire*. Horm Res, 2002. **58**(4): p. 196-205.
28. Auchus, R.J., *Congenital adrenal hyperplasia in adults*. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2010. **17**(3): p. 210-6.
29. Clayton, P.E., et al., *Consensus statement on 21-hydroxylase deficiency from the European Society for Paediatric Endocrinology and the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society*. Horm Res, 2002. **58**(4): p. 188-95.
30. Eugster, E.A., et al., *Height outcome in congenital adrenal hyperplasia caused by 21-hydroxylase deficiency: a meta-analysis*. J Pediatr, 2001. **138**(1): p. 26-32.
31. Bonfig, W., et al., *Reduced final height outcome in congenital adrenal hyperplasia under prednisone treatment: deceleration of growth velocity during puberty*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(5): p. 1635-9.
32. Muirhead, S., E.A. Sellers, and H. Guyda, *Indicators of adult height outcome in classical 21-hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia*. J Pediatr, 2002. **141**(2): p. 247-52.
33. Arlt, W., et al., *Health status of adults with congenital adrenal hyperplasia: a cohort study of 203 patients*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(11): p. 5110-21.
34. Grigorescu-Sido, A., et al., *Growth analysis in patients with 21-hydroxylase deficiency influence of glucocorticoid dosage, age at diagnosis, phenotype and genotype on growth and height outcome*. Horm Res, 2003. **60**(2): p. 84-90.
35. Van der Kamp, H.J., et al., *Longitudinal analysis of growth and puberty in 21-hydroxylase deficiency patients*. Arch Dis Child, 2002. **87**(2): p. 139-44.
36. Bonfig, W., et al., *Hydrocortisone dosing during puberty in patients with classical congenital adrenal hyperplasia: an evidence-based recommendation*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(10): p. 3882-8.
37. Falhammar, H. and M. Thoren, *Clinical outcomes in the management of congenital adrenal hyperplasia*. Endocrine, 2012. **41**(3): p. 355-73.
38. Falhammar, H., et al., *Cardiovascular risk, metabolic profile, and body composition in adult males with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency*. Eur J Endocrinol, 2011. **164**(2): p. 285-93.
39. Mooij, C.F., et al., *Unfavourable trends in cardiovascular and metabolic risk in paediatric and adult patients with congenital adrenal hyperplasia?* Clin Endocrinol (Oxf), 2010. **73**(2): p. 137-46.
40. Finkelstein, G.P., et al., *Clinical characteristics of a cohort of 244 patients with congenital adrenal hyperplasia*. J Clin Endocrinol Metab, 2012. **97**(12): p. 4429-38.

41. Mooij, C.F., et al., *Adult patients with congenital adrenal hyperplasia have elevated blood pressure but otherwise a normal cardiovascular risk profile*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e24204.
42. Falhammar, H., et al., *Metabolic profile and body composition in adult women with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(1): p. 110-6.
43. Sartorato, P., et al., *Cardiovascular risk factors and ultrasound evaluation of intima-media thickness at common carotids, carotid bulbs, and femoral and abdominal aorta arteries in patients with classic congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(3): p. 1015-8.
44. Weinstein, R.S., *Clinical practice. Glucocorticoid-induced bone disease*. N Engl J Med, 2011. **365**(1): p. 62-70.
45. Chakhtoura, Z., et al., *Impact of total cumulative glucocorticoid dose on bone mineral density in patients with 21-hydroxylase deficiency*. Eur J Endocrinol, 2008. **158**(6): p. 879-87.
46. Falhammar, H., et al., *Fractures and bone mineral density in adult women with 21-hydroxylase deficiency*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(12): p. 4643-9.
47. Cameron, F.J., et al., *Bone mineral density and body composition in congenital adrenal hyperplasia*. J Clin Endocrinol Metab, 1995. **80**(7): p. 2238-43.
48. Sciannamblo, M., et al., *Reduced bone mineral density and increased bone metabolism rate in young adult patients with 21-hydroxylase deficiency*. J Clin Endocrinol Metab, 2006. **91**(11): p. 4453-8.
49. Jaaskelainen, J., et al., *Child rate, pregnancy outcome and ovarian function in females with classical 21-hydroxylase deficiency*. Acta Obstet Gynecol Scand, 2000. **79**(8): p. 687-92.
50. Casteras, A., et al., *Reassessing fecundity in women with classical congenital adrenal hyperplasia (CAH): normal pregnancy rate but reduced fertility rate*. Clin Endocrinol (Oxf), 2009. **70**(6): p. 833-7.
51. Bidet, M., et al., *Fertility in women with nonclassical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency*. J Clin Endocrinol Metab, 2010. **95**(3): p. 1182-90.
52. Falhammar, H., et al., *Fertility, sexuality and testicular adrenal rest tumors in adult males with congenital adrenal hyperplasia*. Eur J Endocrinol, 2012. **166**(3): p. 441-9.
53. Reisch, N., et al., *High prevalence of reduced fecundity in men with congenital adrenal hyperplasia*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(5): p. 1665-70.
54. Cabrera, M.S., M.G. Vogiatzi, and M.I. New, *Long term outcome in adult males with classic congenital adrenal hyperplasia*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(7): p. 3070-8.
55. Stikkelbroeck, N.M., et al., *High prevalence of testicular adrenal rest tumors, impaired spermatogenesis, and Leydig cell failure in adolescent and adult males with congenital adrenal hyperplasia*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(12): p. 5721-8.
56. Hines, M., C. Brook, and G.S. Conway, *Androgen and psychosexual development: core gender identity, sexual orientation and recalled childhood gender role behavior in women and men with congenital adrenal hyperplasia (CAH)*. J Sex Res, 2004. **41**(1): p. 75-81.
57. Claahsen-van der Grinten, H.L., A.R. Hermus, and B.J. Otten, *Testicular adrenal rest tumours in congenital adrenal hyperplasia*. Int J Pediatr Endocrinol, 2009. **2009**: p. 624823.
58. Claahsen-van der Grinten, H.L., et al., *Prevalence of testicular adrenal rest tumours in male children with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency*. Eur J Endocrinol, 2007. **157**(3): p. 339-44.
59. Martinez-Aguayo, A., et al., *Testicular adrenal rest tumors and Leydig and Sertoli cell function in boys with classical congenital adrenal hyperplasia*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(12): p. 4583-9.

60. Stikkelbroeck, N.M., et al., *Prevalence of ovarian adrenal rest tumours and polycystic ovaries in females with congenital adrenal hyperplasia: results of ultrasonography and MR imaging*. Eur Radiol, 2004. **14**(10): p. 1802-6.
61. Tiosano, D., et al., *Ovarian adrenal rest tumor in a congenital adrenal hyperplasia patient with adrenocorticotropin hypersecretion following adrenalectomy*. Horm Res Paediatr, 2010. **74**(3): p. 223-8.
62. Claahsen-van der Grinten, H.L., et al., *Testicular tumors in patients with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency show functional features of adrenocortical tissue*. J Clin Endocrinol Metab, 2007. **92**(9): p. 3674-80.
63. Stikkelbroeck, N.M., et al., *Asymptomatic testicular adrenal rest tumours in adolescent and adult males with congenital adrenal hyperplasia: basal and follow-up investigation after 2.6 years*. J Pediatr Endocrinol Metab, 2004. **17**(4): p. 645-53.
64. Shiroishi, T., et al., *Lethal deletion of the complement component C4 and steroid 21-hydroxylase genes in the mouse H-2 class III region, caused by meiotic recombination*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(9): p. 2819-23.
65. Riepe, F.G., et al., *Congenital adrenal hyperplasia: the molecular basis of 21-hydroxylase deficiency in H-2^{aw18} mice*. Endocrinology, 2005. **146**(6): p. 2563-74.
66. Gotoh, H., et al., *Survival of steroid 21-hydroxylase-deficient mice without endogenous corticosteroids after neonatal treatment and genetic rescue by transgenesis as a model system for treatment of congenital adrenal hyperplasia in humans*. Endocrinology, 1994. **135**(4): p. 1470-6.
67. Gotoh, H., et al., *Steroid 21-hydroxylase deficiency in mice*. Endocrinology, 1988. **123**(4): p. 1923-7.
68. Bornstein, S.R., et al., *Adrenomedullary function is severely impaired in 21-hydroxylase-deficient mice*. FASEB J, 1999. **13**(10): p. 1185-94.
69. Nandi, J., et al., *In vitro steroidogenesis by the adrenal glands of mice*. Endocrinology, 1967. **80**(4): p. 576-82.
70. van Weerden, W.M., et al., *Adrenal glands of mouse and rat do not synthesize androgens*. Life Sci, 1992. **50**(12): p. 857-61.
71. Payne, A.H. and D.B. Hales, *Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones*. Endocr Rev, 2004. **25**(6): p. 947-70.
72. Hu, M.C., et al., *Regulation of steroidogenesis in transgenic mice and zebrafish*. Mol Cell Endocrinol, 2001. **171**(1-2): p. 9-14.
73. Loriaux, D.L., H.J. Ruder, and M.B. Lipsett, *Plasma steroids in congenital adrenal hyperplasia*. J Clin Endocrinol Metab, 1974. **39**(4): p. 627-30.
74. Hatano, O., et al., *Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1*. Genes Cells, 1996. **1**(7): p. 663-71.
75. O'Shaughnessy, P.J., et al., *Adrenocorticotrophic hormone directly stimulates testosterone production by the fetal and neonatal mouse testis*. Endocrinology, 2003. **144**(8): p. 3279-84.
76. Hu, L., et al., *Expression of Cyp21a1 and Cyp11b1 in the fetal mouse testis*. Reproduction, 2007. **134**(4): p. 585-91.
77. Val, P., K. Jeays-Ward, and A. Swain, *Identification of a novel population of adrenal-like cells in the mammalian testis*. Dev Biol, 2006. **299**(1): p. 250-6.
78. Johnston, H., P.J. King, and P.J. O'Shaughnessy, *Effects of ACTH and expression of the melanocortin-2 receptor in the neonatal mouse testis*. Reproduction, 2007. **133**(6): p. 1181-7.
79. Hu, M.C., et al., *Steroid deficiency syndromes in mice with targeted disruption of Cyp11a1*. Mol Endocrinol, 2002. **16**(8): p. 1943-50.
80. Li, Y., T. Taketo, and Y.F. Lau, *Isolation of fetal gonads from embryos of timed-pregnant mice for morphological and molecular studies*. Methods Mol Biol, 2012. **825**: p. 3-16.

81. Martineau, J., et al., *Male-specific cell migration into the developing gonad*. Curr Biol, 1997. **7**(12): p. 958-68.
82. Nishino, K., et al., *Characterization of mesonephric cells that migrate into the XY gonad during testis differentiation*. Exp Cell Res, 2001. **267**(2): p. 225-32.
83. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
84. Spiegelman, S., K.F. Watson, and D.L. Kacian, *Synthesis of DNA complements of natural RNAs: a general approach*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. **68**(11): p. 2843-5.
85. Nolan, T., R.E. Hands, and S.A. Bustin, *Quantification of mRNA using real-time RT-PCR*. Nat Protoc, 2006. **1**(3): p. 1559-82.
86. Mullins, L.J., et al., *Cyp11b1 null mouse, a model of congenital adrenal hyperplasia*. J Biol Chem, 2009. **284**(6): p. 3925-34.
87. Clark, A.J. and L.A. Metherell, *Mechanisms of disease: the adrenocorticotropin receptor and disease*. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2006. **2**(5): p. 282-90.
88. Nimura, M., et al., *Spatial and temporal patterns of expression of melanocortin type 2 and 5 receptors in the fetal mouse tissues and organs*. Anat Embryol (Berl), 2006. **211**(2): p. 109-17.
89. Miller, W.L. and H.S. Bose, *Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking*. J Lipid Res, 2011. **52**(12): p. 2111-35.
90. Shi, Y., M.D. Schonemann, and S.H. Mellon, *Regulation of P450c17 expression in the early embryo depends on GATA factors*. Endocrinology, 2009. **150**(2): p. 946-56.
91. Strauss, L., et al., *Increased exposure to estrogens disturbs maturation, steroidogenesis, and cholesterol homeostasis via estrogen receptor alpha in adult mouse Leydig cells*. Endocrinology, 2009. **150**(6): p. 2865-72.
92. Ivell, R. and R. Anand-Ivell, *Biology of insulin-like factor 3 in human reproduction*. Hum Reprod Update, 2009. **15**(4): p. 463-76.
93. Bogatcheva, N.V., et al., *T222P mutation of the insulin-like 3 hormone receptor LGR8 is associated with testicular maldescent and hinders receptor expression on the cell surface membrane*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **292**(1): p. E138-44.
94. Nef, S. and L.F. Parada, *Cryptorchidism in mice mutant for InsI3*. Nat Genet, 1999. **22**(3): p. 295-9.
95. Pathirana, I.N., et al., *Insulin-like peptide 3 stimulates testosterone secretion in mouse Leydig cells via cAMP pathway*. Regul Pept, 2012. **178**(1-3): p. 102-6.
96. Rouiller-Fabre, V., et al., *Effect of anti-Mullerian hormone on Sertoli and Leydig cell functions in fetal and immature rats*. Endocrinology, 1998. **139**(3): p. 1213-20.
97. Wu, X., et al., *Pubertal and adult Leydig cell function in Mullerian inhibiting substance-deficient mice*. Endocrinology, 2005. **146**(2): p. 589-95.
98. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
99. Burnett, R., Y. Guichard, and E. Barale, *Immunohistochemistry for light microscopy in safety evaluation of therapeutic agents: an overview*. Toxicology, 1997. **119**(1): p. 83-93.
100. Rutgers, J.L., R.H. Young, and R.E. Scully, *The testicular "tumor" of the adrenogenital syndrome. A report of six cases and review of the literature on testicular masses in patients with adrenocortical disorders*. Am J Surg Pathol, 1988. **12**(7): p. 503-13.
101. Keeney, D.S., C.M. Jenkins, and M.R. Waterman, *Developmentally regulated expression of adrenal 17 alpha-hydroxylase cytochrome P450 in the mouse embryo*. Endocrinology, 1995. **136**(11): p. 4872-9.
102. Lefebvre, H., et al., *Intraadrenal adrenocorticotropin production in a case of bilateral macronodular adrenal hyperplasia causing Cushing's syndrome*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(7): p. 3035-42.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Begriff
17-OHP	17-Hydroxyprogesteron
21OHD	21-Hydroxylase Defizienz
3 β -HSD	3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AGS	Adrenogenitales Syndrom
AMH	Anti-Müller-Hormon
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATII	Angiotensin II
aw18	H-2aw18
BMI	Body-Mass-Index
C4	Gen für 4. Komponente des Komplementsystems
cDNA	Komplementäre DNA
CRH	Corticotropin Releasing Hormone
Ct-Wert	Cycle Threshold-Wert
CYP11A1	Humanes und murines Gen für das Cholesterol Side-Chain Cleavage Enzyme P450 _{scc}
CYP11B1	Humanes und murines Gen für die 11 β -Hydroxylase
CYP11B2	Humanes und murines Gen für die Aldosteron-Synthase
CYP17A1	Humanes und murines Gen für die 17 α -Hydroxylase
CYP21A1	Murines Gen für die 21-Hydroxylase
CYP21A1P	Pseudogen der humanen 21-Hydroxylase
CYP21A2	Gen der humanen 21-Hydroxylase
CYP21A2-P	Murines Pseudogen für die 21-Hydroxylase
DAB	Diaminobenzidin
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
HCG	Humanes Choriogonadotropin
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	Human Leukocyte Antigen
HSD3B1	Humanes und murines Gen für die 3 β - Hydroxysteroiddehydrogenase
IHC	Immunhistochemie
INSL3	Insulin-like 3
LH	Luteinisierendes Hormon
MC2R	Melanocortin-2-Rezeptor
MHC	Major Histocompatibility Complex
MMLV	Moloney Murine Leukemia Virus
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
OART	Ovarieller adrenaler Resttumor
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen

Abkürzung	Begriff
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PRA	Plasma-Renin-Aktivität
Primär-AK	Primär-Antikörper
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RXFP2	Rezeptor für INSL3
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Sekundär-AK	Sekundär-Antikörper
SEM	Standard error of the mean
SF-1	Steroidogenic tissue-specific transcription factor 1
Slp	Sex-limited Protein
SV	simple virilising
SW	Salt-wasting
TART	Testikulärer adrenaler Resttumor
TBE	Tris-Borat-EDTA
TNES	Tris, NaCl, EDTA, SDS
Trishydroxymethylaminomethan	Tris
UV	Ultraviolett

8. Danksagung

Mein Dank gilt einer Vielzahl an Unterstützern, Förderern und Helfern. Zuallererst möchte ich Herrn Prof. Dr. Reincke für die Möglichkeit danken, an seiner Klinik experimentell zu arbeiten und promovieren zu dürfen.

Großer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Felix Beuschlein, der mich mit außerordentlichem Engagement und Tatkraft unterstützte. Vielen herzlichen Dank für die konstruktive und intensive Begleitung meiner Arbeit!

Meinen größtmöglichen Dank möchte ich meiner Betreuerin PD Dr. Nicole Reisch aussprechen. Mit weit über das normale Maß hinausgehendem Einsatz betreute sie meine Arbeit. Unabhängig von allen Umständen unterstützte sich mich und war zu jeder Tages- und Nachtzeit als Betreuerin für mich zu sprechen. Herzlichsten Dank Nicole!

Sehr bedanken möchte ich mich bei Brigitte Mauracher und Igor Shapiro, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen und mir über so manche Klippe hinweg halfen. Bedanken möchte ich mich auch bei Robert und Klaus Weinberger, die mich als Tierpfleger sehr gut bei meinem intensiven Mauszuchtprogramm unterstützten.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern, meiner Schwester Julia Weniger und meiner Freundin Stefanie König. Vielen Dank für euer großes Verständnis und eure große Hilfe bei allen Schwierigkeiten, die eine Doktorarbeit bietet. Und natürlich bedanke ich mich auch bei allen Lesern, die meine Doktorarbeit bis zu dieser Zeile gelesen haben!

9. Publikationen

9.1. Vorträge

Weniger M, Scherr M, Veitenhansl M, Reincke M, Beuschlein F, Reisch N

„Successful conservative treatment of 22ml testicular adrenal rest tumors in a patient with 21-hydroxylase deficiency”

Zweiter Platz beim wissenschaftlichen Wettbewerb für interessante Fallstudien bei der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, Sektion Angewandte Endokrinologie (06/2010)

9.2. Übersichtsarbeiten

Weniger M, Reisch N, Kuhnle-Krahl U

„Das adrenogenitale Syndrom aufgrund eines 21-Hydroxylasemangels bei Männern“

Klinische Endokrinologie und Stoffwechsel (05/2012)

10. Eidesstattliche Versicherung

Weniger, Maximilian Andreas

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Charakterisierung der Entwicklung testikulärer adrenaler Resttumore im Tiermodell 21-Hydroxylase defizienter Mäuse“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand